



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

COMPARAÇÃO DA VARIAÇÃO DOS VALORES SÉRICOS DE PROTEÍNA C-  
REACTIVA (PCR) ENTRE CIRURGIA COM LASER DE DIÓXIDO DE CARBONO (CO<sub>2</sub>)  
E CIRURGIA COM LÂMINA DE BISTURI, NOS PERÍODOS PRÉ- E PÓS-CIRÚRGICOS  
EM DOENTES DA ESPÉCIE *CANIS FAMILIARIS*

LEVI PICÃO DA SILVA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutor José Manuel Chéu Limão Oliveira

Dr. Pedro Ricardo Almeida Santos Azevedo

ORIENTADOR

Dr. Pedro Ricardo Almeida Santos  
Azevedo

CO-ORIENTADOR

Doutor Luis Miguel Alves Carreira

2018

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

COMPARAÇÃO DA VARIAÇÃO DOS VALORES SÉRICOS DE PROTEÍNA C-  
REACTIVA (PCR) ENTRE CIRURGIA COM LASER DE DIÓXIDO DE CARBONO (CO<sub>2</sub>)  
E CIRURGIA COM LÂMINA DE BISTURI, NOS PERÍODOS PRÉ- E PÓS-CIRÚRGICOS  
EM DOENTES DA ESPÉCIE *CANIS FAMILIARIS*

LEVI PICÃO DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutor José Manuel Chéu Limão Oliveira

Dr. Pedro Ricardo Almeida Santos Azevedo

ORIENTADOR

Dr. Pedro Ricardo Almeida Santos  
Azevedo

CO-ORIENTADOR

Doutor Luis Miguel Alves Carreira

2018

LISBOA

---

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer a todos os que me deram forças durante este curso, durante o estágio curricular, durante a escrita desta dissertação, durante todo este percurso.

Começando pelos meus orientadores, Professor Miguel Carreira e Dr. Pedro Azevedo, por todo o conhecimento que me deram, pela ajuda na escrita desta dissertação, e pela paciência que exerceram no processo que é aturar a minha personagem, mas sobretudo agradeço a amizade que ao longo do tempo sempre me ofereceram.

A toda a restante equipa do Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis – CMVAA: Dra. Rita Ramalho, Dr. Ricardo Baião e Andreia Marques por também terem sido meus professores, por todo o apoio que me deram durante o estágio, e por sempre me terem feito sentir de uma forma amigável parte da equipa.

Ao CMVAA por ter financiado o presente estudo constituinte desta dissertação de mestrado, e por proporcionar perspectivas futuras para a minha vida enquanto médico veterinário.

Ao Professor Telmo Nunes, por toda a paciência e ajuda que me ofereceu para a realização da análise estatística do presente estudo.

À minha namorada, Paula Martins, que também sendo minha colega terá sido a que mais me acompanhou e ajudou durante toda a jornada que foi este curso, e que apesar de ter a sua própria tese com que se preocupar, me deu forças quando me encontrava mais fatalista, me deu calma quando se instalava em mim o pânico, e me chamou à razão quando a preguiça era mais forte do que eu.

A todos os meus colegas que fizeram tudo isto valer mais a pena, em especial aos meus irmãos de armas de curso, Emanuel Costa e Anthony Rodrigues, que sempre estiveram cá para mim desde o primeiro dia.

Aos meus pais, Ilda Silva e Júlio Silva, por sempre acreditarem no meu sonho de ser veterinário, que apesar de tudo deram o que podiam e o que não podiam, para que isso se tornasse realidade.

Ao meu irmão, Josias Silva, por ser o meu herói, por estar cá sempre para me segurar, e por me dar entre muitas outras coisas, a inspiração de ser melhor e de seguir em frente.

Ao meu primo, Isaque Sanches, por não deixar de ser o meu outro irmão, e por me dar a inspiração de pensar fora da caixa.

Ao meu primo, Tiago Sanches, pelo seu espírito de bondade, por vir a casa dar aquele abraço durante as épocas mais trabalhosas.

À minha tia, Ana Paula Sanches, por ser sempre uma segunda mãe, pelos apoios que ofereceu para que pudesse completar este curso.



# COMPARAÇÃO DA VARIAÇÃO DOS VALORES SÉRICOS DE PROTEÍNA C-REACTIVA (PCR) ENTRE CIRURGIA COM LASER DE DIÓXIDO DE CARBONO (CO<sub>2</sub>) E CIRURGIA COM LÂMINA DE BISTURI, NOS PERÍODOS PRÉ- E PÓS-CIRÚRGICOS EM DOENTES DA ESPÉCIE *CANIS FAMILIARIS*.

## Resumo

No cão, a Proteína C-Reactiva (PCR) representa uma proteína de fase aguda (PFA) assumindo a função de marcador inflamatório, e apresentando maior sensibilidade, estabilidade e uma resposta mais rápida relativamente a outros marcadores inflamatórios, como por exemplo, a contagem de leucócitos (WBC). Comparativamente aos métodos convencionais de incisão cirúrgica, o Laser de Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) está associado a múltiplas vantagens como a menor hemorragia, edema e dor para o doente. O estudo foi realizado numa amostra de 50 cadelas (n=50), dividida aleatoriamente em 2 grupos de 25 animais cada um, e sujeitas a cirurgia do tipo Ovariohisterectomia electiva (OVH). Teve como objectivos: 1) comparar os níveis de inflamação pós-cirúrgica causados pela técnica de incisão com lâmina de bisturi (GB) ou laser de CO<sub>2</sub> (GL) através da quantificação da variação da PCR; 2) avaliar a influência de vários parâmetros na variação da PCR. A cada doente foi realizada uma colheita de um volume de 1 ml de sangue periférico em 2 tempos diferentes: T0 (pré-cirúrgico e logo após a cateterização) e T1 (4 horas após terminar a cirurgia), para quantificar a concentração da PCR. De acordo com os resultados obtidos foi possível verificar a existência de uma diferença estatisticamente significativa na variação da concentração de PCR entre T0 e T1 em GB e GL, com valores mais baixos para as doentes de GL ( $p < 0,01$ ). Considerando que não existiram diferenças estatisticamente significativas para os restantes parâmetros estudados entre GB e GL, é possível concluir que o uso do laser de CO<sub>2</sub> na cirurgia está associado a um melhor controlo do fenómeno de inflamação tecidual num cenário cirúrgico, comparativamente ao uso da lâmina de bisturi. O resultado da sua utilização traduzir-se-á numa recuperação pós-operatória mais rápida e com menor dor para o doente.

**Palavras-chave:** Cão; Proteína C-Reactiva; Laser de Dióxido de Carbono; Lâmina de Bisturi; Cirurgia



# COMPARATIVE STUDY ON THE VARIATION OF C-REACTIVE PROTEIN (CRP) SERUM CONCENTRATIONS BETWEEN SURGERY WITH CARBON DIOXIDE (CO<sub>2</sub>) LASER AND SCALPEL BLADE, IN THE PRE- AND POST-SURGICAL TIME-POINTS IN CANIS FAMILIARIS PATIENTS

## Abstract

In the dog, C-Reactive Protein (CRP) is an acute phase protein (APP) functioning as an inflammatory marker, having a higher sensitivity, stability, and a faster response in comparison with other inflammatory markers, such as white blood cell (WBC) counts. Comparatively with conventional surgery incision methods, the Carbon Dioxide (CO<sub>2</sub>) Laser is associated with multiple advantages like decreased haemorrhage, oedema and pain for the patient. This study was performed on a sample of 50 female dogs (n=50), randomly split by two groups of 25 animals each, and subjected to elective Ovariohysterectomy (OVH) surgery. The study had the following objectives: 1) compare the levels of post-surgical inflammation caused by the incision technique with scalpel blade (GB) or CO<sub>2</sub> laser (GL) through the quantification of CRP; 2) evaluate the influence of several parameters on the variation of CRP concentrations. From each patient, a sample of 1 ml of peripheral blood was collected at two time-points: T0 (pre-surgical and immediately after catheterization) and T1 (4 hours after the end of surgery), to quantify CRP concentration. According to the results obtained there was a statistically significant difference in the variation of CRP concentration between T0 and T1 in GB and GL, with lower values for patients in GL ( $p < 0,01$ ). Considering that there were no statistically significant differences for the remaining parameters studied between GB and GL, it is possible to conclude that the use of the CO<sub>2</sub> laser in surgery is associated with a better control of the tissue inflammation phenomenon in surgical scenario, comparatively to the use of scalpel blade. Its use will result in a faster post-operative recovery with less pain for the patient.

**Keywords:** Dog; C-Reactive Protein; Carbon Dioxide Laser; Scalpel Blade; Surgery.





## Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract .....	v
Índice.....	vii
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Gráficos .....	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	ix
Lista de Símbolos .....	xii
I - Relatório de Actividades de Estágio.....	1
II – Revisão Bibliográfica .....	3
<b>1. A Resposta Inflamatória (RI).....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Fases de Desenvolvimento da RI.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1. Fase de Reconhecimento de Invasão ou Lesão Tecidualar .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.4. Fase de Recuperação da Resposta Inflamatória.....</b>	<b>6</b>
<b>2. Resposta de Fase Aguda (RFA).....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Proteínas de Fase Aguda (PFAs).....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Aplicação das PFAs na prática clínica .....</b>	<b>10</b>
<b>3. Proteína C-Reactiva (PCR) .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. A Influência de Factores Biológicos na Concentração Sérica de PCR .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2. Comparação entre a PCR e outros Marcadores Inflamatórios .....</b>	<b>13</b>
<b>4. O Laser Cirúrgico de Dióxido de Carbono (CO2): Produção e Caracterização .....</b>	<b>14</b>
<b>4.1. As Vantagens e Desvantagens do Laser de CO2 .....</b>	<b>17</b>
<b>4.2. A Aplicação do Laser de CO2 nas Diferentes Áreas Cirúrgicas.....</b>	<b>18</b>
III - Materiais e Métodos.....	20
IV - Resultados.....	22
V - Discussão .....	32
VI - Conclusão .....	35
VII - Bibliografia.....	36

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Análise de estatística descritiva dos parâmetros em estudo, considerando o total da amostra e cada grupo em separado (GB e GL). .....	22
Tabela 2 - Teste de Wald tipo II (Qui Quadrado) da variação da concentração de PCR entre T0 e T1 em função dos diferentes parâmetros estudados: Técnica cirúrgica, Idade do doente, Peso do doente, Raça do doente, Potência do laser de CO2 e contagem de WBC. 26	
Tabela 3 - Teste de Wilcoxon da relação entre os parâmetros estudados: Idade do doente, Raça do doente, PCR T0 e Técnica de Incisão. ....	27
Tabela 4 - Teste T de Welch da relação entre diferentes parâmetros estudados: Peso do doente, contagem de WBC e Técnica de Incisão. ....	27
Tabela 5 - Estudo de Correlação utilizando o Coeficiente de Spearman entre os vários parâmetros estudados: Idade do doente, Peso do doente, PCR T0; PCR T1; contagem de WBC. ....	29

## Lista de Figuras

Figura 1 - Ilustração simplificada da Resposta de fase aguda, segundo: Cray et al. (2009). Acute phase response in animals: A review. Comparative Medicine, 59(6):517-526. ....	8
Figura 2 - Ilustração do aumento das concentrações das proteínas de fase aguda no cão face a uma agressão ao organismo, segundo: Tizard, I.(2013). Veterinary Immunology. Chapter 6 - Systemic Response to Inflammation:54. ....	10
Figura 3 - Fotografia original do sistema de Laser de CO2 cirúrgico - modelo Aesculight 1507 Surgical Laser System, patrocinado pela Aesculight® e utilizado na realização do estudo da presente tese subordinado ao tema: “Comparação da variação dos valores séricos de Proteína C-Reactiva (PCR) entre cirurgia com laser de dióxido de carbono (CO2) e cirurgia com lâmina de bisturi, nos períodos pré- e pós-cirúrgicos em doentes da espécie Canis familiaris” (Carreira, 2018). ....	16
Figura 4 - Fotografia original de um procedimento de exérese de massa oncológica utilizando o sistema de Laser de CO2 cirúrgico - Aesculight 1507 Surgical Laser System, patrocinado pela Aesculight® (Carreira, 2018). ....	16

## Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Frequência Relativa (FR) das várias actividades na área de patologia médica, nas diferentes espécies. ....	2
Gráfico 2 – Diagrama de Extremos e Quartis relativo à Idade, para os grupos B e L. ....	24

Gráfico 3 – Diagrama de Extremos e Quartis relativo ao Peso, para os grupos B e L.....	24
Gráfico 4 – Diagrama de Extremos e Quartis relativo à concentração de PCR no momento T0, para os grupos B e L. ....	24
Gráfico 5 – Diagrama de Extremos e Quartis relativo à concentração de PCR no momento T1, para os grupos B e L. ....	25
Gráfico 6 – Diagrama de Extremos e Quartis relativo à diferença entre a concentração de PCR em T1 e T0, para os grupos B e L.....	25
Gráfico 7 – Diagrama de Extremos e Quartis relativo aos WBC, para os grupos B e L.....	25
Gráfico 8 – Variação da concentração da PCR em função do tempo (período peri-operatório), de acordo com o tipo de técnica de incisão utilizando: Bisturi ou Laser de CO2.....	28
Gráfico 9 – Relação entre a variação da concentração de PCR e o Peso do doente.....	28
Gráfico 10 - Variação da concentração da PCR ao longo do tempo, em função do tipo de raça dos doentes.....	29
Gráfico 11 – Relação entre a Idade e o Peso. ....	30
Gráfico 12 – Relação entre a Idade e as concentrações de PCR em T0. ....	30
Gráfico 13 – Relação entre a Idade e os WBC. ....	30
Gráfico 14 – Relação entre o Peso e as concentrações de PCR em T0. ....	31
Gráfico 15 – Relação entre o Peso e os WBC. ....	31
Gráfico 16 – Relação entre os WBC e a concentração de PCR em T0. ....	31

### **Lista de Abreviaturas e Siglas**

ACTH	Hormona Adrenocorticotrópica
AGP	$\alpha$ 1-Glicoproteína Ácida
AINES	Anti-inflamatórios não esteroides
C3	Proteína 3 do sistema de complemento
C4	Proteína 4 do sistema de complemento
CBP	<i>Cortisol Binding Protein</i>
CD35	<i>Cluster of Differentiation 35</i>
CD64	<i>Cluster of Differentiation 64</i>
CMVAA	Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis

Cp	Ceruloplasmina
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX	Ciclo-Oxigenase
COX-2	Ciclo-Oxigenase-2
DAMPs	<i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FcγRI	<i>Fc-gamma receptor 1</i>
FcγRII	<i>Fc-gamma receptor 2</i>
FR	Frequência Relativa
G-CSF	<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>
GB	Grupo Bisturi
GL	Grupo Laser
ICAM-1	<i>InterCelular Adhesion Molecule</i>
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-23	Interleucina-23
IFN-γ	Interferão-gama
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LDL	lipoproteína de densidade baixa
LBP	<i>LPS Binding Protein</i>
HDL	lipoproteína de densidade elevada
Hp	Haptoglobina
M1	Macrófagos produtores de citocinas pro-inflamatórias

M2	Macrófagos produtores de citocinas com efeitos anti-inflamatórios
NK	<i>Natural Killer</i>
NOS-2	Monóxido de Azoto Sintase-2
OVH	Ovariohisterectomia
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PCR	Proteína C-Reactiva
PFA	Proteínas de Fase Aguda
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
RBP	<i>Retinol Binding Protein</i>
RFA	Resposta de Fase Aguda
RPLA	<i>Reverse Passive Latex Agglutination</i>
RI	Resposta Inflamatória
SAA	Amilóide A Sérica
T0	Momento imediato à cateterização
T1	4 horas após ter terminado a cirurgia
TA	Total da Amostra
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
TLRs	<i>Toll-Like Receptors</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor-alfa</i>
TR-IFMA	<i>Time-Resolved ImmunoFluoriMetric Assay</i>
TTR	Transtirretina
VEGF	<i>Vascular Endothelium Growth Factor</i>
WBC	<i>Leucócitos</i>

## Lista de Símbolos

$\Delta$	Varição
$>$	Maior
$<$	Menor
$=$	Igual
$\pm$	Desvio padrão
$\%$	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
$\text{cm}^2$	Centímetros quadrados
kDa	Quilo Dalton
Kg	Quilograma
mg/kg	Miligramas por quilograma
mg/dl	Miligramas por decilitro
mm	Milímetros
n	Amostra
n <sup>o</sup>	Número
nm	Nanómetros
W	Watts

## **I - Relatório de Actividades de Estágio**

O Estágio curricular com um total de 1350 horas foi realizado no Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis - CMVAA, sob a Orientação do Dr. Pedro Azevedo e Co-orientação do Professor Doutor Miguel Carreira, entre os meses de Setembro de 2017 a Março de 2018. Durante este período tive a oportunidade de adquirir novos conhecimentos nas áreas da Medicina Preventiva, Imagiologia, Patologia Médica e Patologia Cirúrgica do Cão, Gato e Exóticos.

Houve ainda espaço para fazer duas apresentações científicas nas reuniões do CMVAA subordinadas aos temas de: “Síndrome de Cushing no Cão e no Gato”, e “Diabetes Mellitus no Cão e no Gato”.

Do estudo realizado ao longo do período de estágio, e totalmente financiado pelo CMVAA, resultou o meu trabalho de Tese de Mestrado em Medicina Veterinária intitulada de: “COMPARAÇÃO DA VARIAÇÃO DOS VALORES SÉRICOS DE PROTEÍNA C-REACTIVA (PCR) ENTRE CIRURGIA COM LASER DE DIÓXIDO DE CARBONO (CO<sub>2</sub>) E CIRURGIA COM LÂMINA DE BISTURI, NOS PERÍODOS PRÉ- E PÓS-CIRÚRGICOS EM DOENTES DA ESPÉCIE *CANIS FAMILIARIS*”, e a submissão de um artigo a uma revista científica indexada internacional da especialidade.

Na área da Medicina preventiva, tive a possibilidade de assistir e participar em várias consultas que contemplam o acto de vacinação, identificação electrónica, desparasitação, consulta informativa, certificados oficiais, preenchimento de boletim de sanidade, preenchimento de passaporte internacional, entre outras valências.

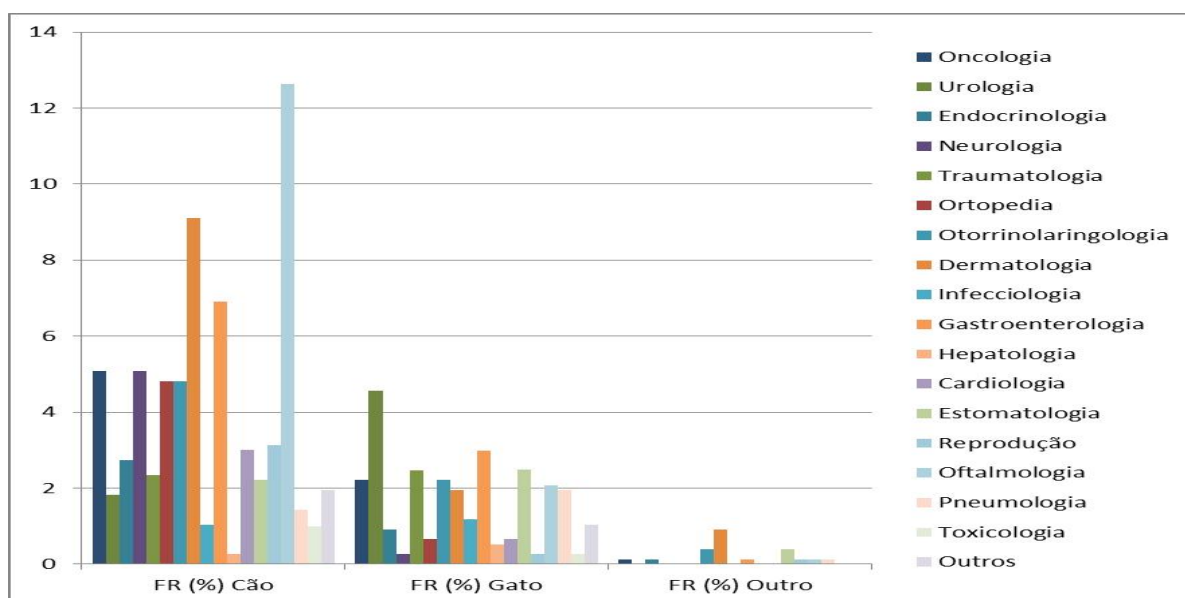
Na área da Imagiologia, aprendi a posicionar os doentes para a realização de radiografias digitais, ecografia transabdominal, ecografia transfontanelar, e ecocardiografia. Tive ainda a possibilidade de colocar em prática as minhas capacidades de interpretação das imagens radiológicas digitais, de ecografia e de tomografia computadorizada.

Na área da Patologia Médica, foi-me possível acompanhar múltiplos casos clínicos primários e de referência, inseridos nas diferentes áreas de actuação como a oncologia, urologia, endocrinologia, neurologia, traumatologia, ortopedia, otorrinolaringologia, dermatologia, infecciologia, gastroenterologia, hepatologia, cardiologia, estomatologia, reprodução, oftalmologia, pneumologia e toxicologia clínica. O gráfico 1 mostra a expressão das diferentes áreas de actuação médica no cão, no gato e nos exóticos. Houve assim a oportunidade de adquirir conhecimentos sobre as diferentes entidades clínicas, protocolos terapêuticos, e monitorização de seguimento dos doentes. Nesta área da patologia médica, realizei de perto todo o trabalho associado ao doente sujeito a internamento, conseguindo



reforçar o conhecimento prático de actividades como cateterização, administração de medicação parenteral e princípios de fluidoterapia. Desenvolvi ainda capacidades de pensamento e de acção imediata perante situações de urgência e emergência. De referir ainda a possibilidade de aprender a realizar a abordagem ao doente e ao cuidador nos diferentes cenários médicos. Realizei e interpretei ainda os resultados das diferentes provas laboratoriais, tais como: hemograma, bioquímicas sanguíneas, ionograma, urianálises, serologias infecciosas. Foi ainda possível fazer a preparação de material biológico para envio para laboratório externo para realização de exames como: titulação de anticorpos, doseamentos hormonais e de fármacos, citologia e histopatologia.

Gráfico 1 – Frequência Relativa (FR) das várias actividades na área de patologia médica, nas diferentes espécies.



Por fim, no campo da Patologia Cirúrgica tive a oportunidade de assistir e participar auxiliando directamente como cirurgião júnior, circulante e anestesista, em múltiplas cirurgias das diferentes especialidades tais como: reprodução, oncologia, ortopedia e traumatologia, neurologia, plástica e reconstrutiva, gastroenterologia, otorrinolaringologia, odontologia, urologia, entre outras. Houve ainda a possibilidade de contactar pela primeira vez e de trabalhar com a técnica sofisticada de Laser de Dióxido de Carbono (CO2) cirúrgico.

## **II – Revisão Bibliográfica**

### **1. A Resposta Inflamatória (RI)**

O corpo tem a capacidade de estabelecer de modo célere um conjunto de mecanismos de reconhecimento de agentes agressores como bactérias, vírus, fungos, entre outros, activando o controlo e a destruição destes de modo a que a integridade do indivíduo não seja colocada em causa. Estes mecanismos, são constituintes dos subsistemas do sistema imunitário inato, dos quais se destaca a Resposta Inflamatória (RI), a qual é promovida e desenvolvida por um conjunto de células e citocinas que participam com o intuito de restaurar os tecidos lesionados (Tizard, 2013).

#### **1.1. Fases de Desenvolvimento da RI**

A RI é composta por 4 principais fases de desenvolvimento, destacando-se: 1) o reconhecimento de invasão ou lesão tecidular; 2) a libertação de mediadores inflamatórios; 3) a acção de células fagocitárias; e 4) a recuperação da resposta inflamatória.

##### **1.1.1. Fase de Reconhecimento de Invasão ou Lesão Tecidular**

A RI é activada sempre que são reconhecidos sinais que representem um potencial perigo à integridade do organismo. Estes sinais podem ser de origem exógena (moléculas de origem microbiana), designados de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês *Pathogen Associated Molecular Patterns* - PAMPs), ou de origem endógena (moléculas provenientes de células lesadas ou destruídas) designados de Padrões Moleculares Associados a Lesão (do inglês, *Damage Associated Molecular Patterns* - DAMPs) (Tizard, 2013).

Estes sinais (PAMPs ou DAMPs) são reconhecidos por receptores presentes nas células sentinela denominados de receptores de reconhecimento de padrões (do inglês *Pattern Recognition Receptors* - PRRs) estimulando de imediato o sistema imunitário inato.

No grupo dos PRRs, destacam-se os Receptores do Tipo Toll, (do inglês *Toll-Like Receptors* - TLRs), que são receptores glicoproteicos transmembranários presentes em células sentinela, como os macrófagos, mastócitos e células dendríticas; mas também em células epiteliais do tracto respiratório e da tracto intestinal (Tizard, 2013).

### 1.1.2. Fase da Libertação de Mediadores Inflamatórios

Quando PAMPs ou DAMPs se ligam aos TLRs correspondentes, são gerados e transmitidos à célula sinais promotores de produção e de libertação de moléculas pró-inflamatórias, denominadas de citocinas, as quais são proteínas que exibem inúmeras funções de regulação, influenciando a actividade das células envolvidas na defesa do organismo. As 3 citocinas mais importantes são: 1) a Interleucina-1 (IL-1); 2) a Interleucina-6 (IL-6); 3) e o Factor de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , do inglês *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ), sendo activadas por acção de uma enzima específica designada de Caspase-1 (Tizard, 2013).

No que respeita à IL-1, ela actua nas células endoteliais de modo a iniciar e amplificar a RI, facilitando a adesão dos neutrófilos ao local alterado. Também estimula por parte dos macrófagos, a produção das enzimas Monóxido de Azoto Sintase-2 (NOS-2, do inglês *Nitric Oxide Synthase*) e Ciclo-Oxigenase-2 (COX-2), que em associação com o TNF- $\alpha$ , actuam a nível cerebral provocando no doente febre, letargia e anorexia. A nível muscular, mobilizam os aminoácidos, causando dor muscular; e a nível hepático estimulam a produção das chamadas Proteínas de Fase Aguda (PFAs) (Tizard, 2013).

Quanto à IL-6, ela é produzida por macrófagos, linfócitos T e mastócitos, mas também por citocinas como a IL-1 ou o TNF- $\alpha$ . Promove a indução da resposta de fase aguda, podendo regular a transição de uma resposta inflamatória dominada por neutrófilos numa fase inicial, para uma resposta dominada por macrófagos numa fase mais tardia. No entanto, também exerce um papel anti-inflamatório através da inibição de alguns dos efeitos produzidos pelo TNF- $\alpha$  e pela IL-1, promovendo em simultâneo a secreção de antagonistas dos receptores de IL-1 e de Interleucina-10 (IL-10), os quais produzem efeitos anti-inflamatórios (Tizard, 2013).

Por fim, o TNF- $\alpha$ , é responsável pelo aparecimento dos sinais clássicos de inflamação como o calor, o rubor, o edema e a dor, sendo maioritariamente produzido por células sentinela, mas também por células endoteliais, linfócitos T e B, e fibroblastos. Tem como funções: 1) atrair neutrófilos aos locais de lesão tecidular, aumentando a sua capacidade de adesão ao endotélio vascular; 2) estimular a fagocitose macrofágica e a produção de substâncias oxidantes, e de IL-1; 3) amplificar e prolongar a inflamação através de enzimas NOS-2 e COX-2 por activação de mastócitos; 4) e facilitar a transição de resposta imunitária inata para resposta imunitária adquirida, ao apresentar os antigénios e ao activar os linfócitos T. De referir que a produção desta molécula, também é estimulada por neurotransmissores, tais como neuroquinina-1 (Tizard, 2013).

### 1.1.3. Fase de Acção de Células Fagocitárias

Existem 2 tipos de células envolvidas no processo de fagocitose: os neutrófilos e os macrófagos, os quais se complementam entre si. Os neutrófilos respondem rapidamente à presença de agentes invasores, enquanto que os macrófagos, são mais lentos e fagocitam de forma muito mais eficiente e repetida do que os primeiros (Tizard, 2013).

A produção de neutrófilos é regulada pelo Factor Estimulador de Colónias de Granulócitos (do inglês *Granulocyte Colony Stimulating Factor* - G-CSF), cuja produção é regulada pela taxa de apoptose por eles apresentada. Ao nível da medula óssea, as células estaminais também expressam TLRs, induzindo a produção de neutrófilos, cujos grânulos ricos em enzimas antibacterianas, também promovem o aumento da permeabilidade vascular, a aderência de monócitos ao endotélio vascular, a libertação de citocinas por parte de macrófagos, e ainda a activação de células dendríticas (responsáveis pela apresentação antigénica) (Tizard, 2013).

A activação dos neutrófilos, que ocorre após adesão às integrinas, que são moléculas presentes nas células endoteliais como a Molécula de Adesão Intercelular-1 (do inglês *InterCellular Adhesion Molecule* – ICAM-1), permite a libertação de elastase, defensinas e oxidantes, as quais estimulam a libertação de TNF- $\alpha$  presente na membrana de macrófagos, contribuindo assim para uma maior atracção de neutrófilos à área afectada (Tizard, 2013).

Uma vez iniciada a apoptose, os neutrófilos são então removidos pelas células do sistema mononuclear fagocitário do tipo células dendríticas, as quais libertam o denominado Factor de Transformação do Crescimento- $\beta$  (do inglês *Transforming Growth Factor*-  $\beta$  - TGF- $\beta$ ), IL-6 e Interleucina-23 (IL-23) no caso dos neutrófilos conterem material bacteriano no seu interior, e irão estimular a produção de mais neutrófilos. Na condição de os neutrófilos não conterem componentes bacterianos, verifica-se a libertação de IL-10 e TGF- $\beta$ , promovendo a produção de células T regulatórias as quais irão suprimir a RI (Tizard, 2013).

No que respeita aos macrófagos, eles têm múltiplas funções como libertação de um conjunto de citocinas que promovem respostas de imunidade inata e adquirida; regulam a RI e ainda contribuem directamente no processo de reparação de tecidos lesados através da remoção de células mortas ou danificadas (Tizard, 2013).

Os macrófagos adoptam diferentes nomes de acordo com o tecido onde iniciam a sua especialização. São substituídos a uma taxa relativamente baixa (cerca de 1% por dia), e a libertação de DAMPs provenientes de tecidos lesados, estimula os macrófagos residentes a produzirem o TNF- $\alpha$  e a IL-6, bem como outras quimiocinas que irão atrair mais neutrófilos à região. Para além de participarem na destruição de microorganismos, também libertam

enzimas do tipo colagenase e elastase as quais destroem o tecido conjuntivo (Tizard, 2013).

Existem 2 tipos de população macrofágica, sendo eles: as células M1 (que defendem contra invasores e produzem citocinas pro-inflamatórias) e as células M2 (que produzem citocinas com efeitos anti-inflamatórios). As células M1 são produzidas numa fase mais inicial da inflamação, quando esta é necessária ao processo de defesa, enquanto que as células M2 são recrutadas numa fase mais tardia, promovendo a angiogénese, a remodelação tecidual, e a reparação de tecidos lesados (Tizard, 2013).

As citocinas produzidas por macrófagos, em particular o TNF- $\alpha$  e a Interleucina-12 (IL-12), activam uma específica população de linfócitos designados de células *Natural Killer* (NK), os quais por sua vez vão libertar o Interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) que irá promover uma maior activação de macrófagos (Tizard, 2013).

Em cães, 80 a 90% dos microorganismos são removidos ao nível do fígado pelos neutrófilos, os quais são depois fagocitados pelas células de Kupffer presentes nos sinusóides do fígado. No baço, os macrófagos têm receptores do tipo CD64 (do inglês *Cluster of Differentiation 64*), para que as partículas opsonizadas sejam preferencialmente removidas a este nível. Em contraste, no fígado expressam os receptores CD35, de modo a que as partículas opsonizadas pelo componente C3 do sistema complemento sejam removidas no fígado. Endotoxinas bacterianas, estrogénios e lípidos simples estimulam a actividade macrofágica, e consequentemente aumentando a taxa de remoção bacteriana, e o inverso verifica-se com o uso de corticosteróides e de outros fármacos (Tizard, 2013).

#### **1.1.4. Fase de Recuperação da Resposta Inflamatória**

Após a destruição de agentes agressores, a resposta tecidual deve transitar rapidamente de um processo de defesa para um processo de reparação. A população de macrófagos mais precoce (M1) é activada pela via clássica através do TNF- $\alpha$ , com o propósito de destruir agentes invasores. No entanto, estes M1 transformam-se em M2, iniciando então um processo anti-inflamatório (Tizard, 2013).

A fagocitose dos neutrófilos assegurada pelos macrófagos, vai promover a libertação do Factor de Crescimento de Endotélio Vascular (do inglês *Vascular Endothelium Growth Factor* - VEGF), sendo uma fase crucial para o processo de revascularização e reparação de tecidos danificados. Além do mais, os M2, inibem a libertação de elastase e de substâncias oxidantes inicialmente libertadas pelos neutrófilos. A actividade das células M2 também protege a TGF- $\beta$  (citocina anti-inflamatória), de modo a que esta possa inibir a libertação de TNF- $\alpha$ . Também, ao secretarem a IL1- $\beta$ , os macrófagos atraem e activam os fibroblastos, os quais irão penetrar na área afectada e iniciar a síntese de colagénio (Tizard, 2013).

## **2. Resposta de Fase Aguda (RFA)**

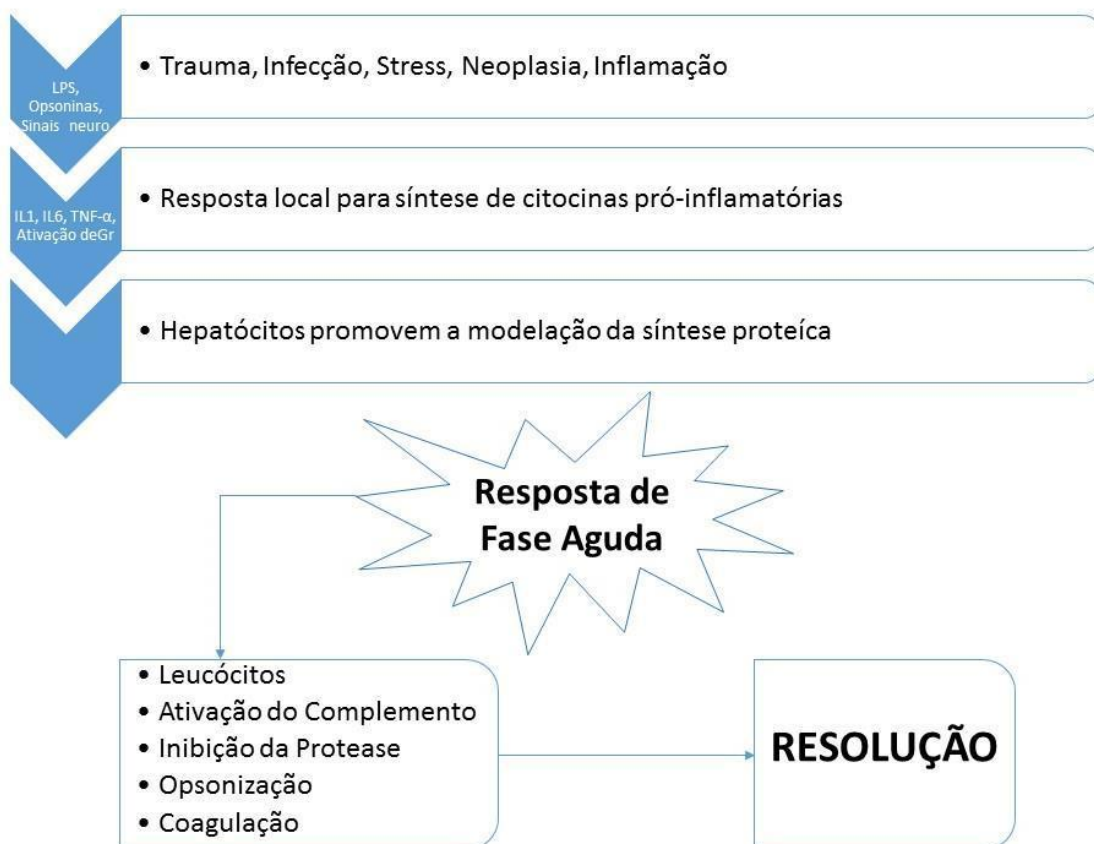
Imediatamente após o contacto com material estranho, o corpo reage inespecificamente utilizando o sistema imunitário inato, desenvolvendo posteriormente uma resposta imunitária adquirida. A Resposta de Fase Aguda (RFA), representa um de vários subsistemas constituintes do sistema imunitário inato, e é um fenómeno presente em todas as espécies animais. Caracteriza-se por uma reacção sistémica, desencadeada por diferentes etiologias, como causas infecciosas, traumáticas, neoplásicas ou imunológicas (Eckersall & Conner, 1988; Cerón, Eckersall & Martínez-Subiela, 2005; Gruys, Toussaint, Niewold & Koopmans, 2005; Cray, Zaias & Altman, 2009), que provoquem lesão tecidular. Como resultado desta agressão, inicia-se a produção de citocinas pró-inflamatórias, que provocam a activação de células alvo como monócitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, plaquetas, queratinócitos e linfócitos T, as quais por sua vez sintetizam e libertam mais citocinas e outros mediadores inflamatórios, que se vão difundindo através do compartimento extracelular e terminando por entrar na circulação sanguínea sistémica (Gruys et al., 2005; Cray et al., 2009).

Das citocinas envolvidas na indução da RFA, as mais importantes são: 1) IL-1; 2) a IL-6; 3) e o TNF- $\alpha$  (Cerón et al., 2005; Gruys et al., 2005; Paltrinieri, 2007; Cray et al., 2009) (Figura 1). A RFA caracteriza-se por diferentes efeitos sistémicos, nomeadamente, febre, anorexia, leucocitose, diminuição da concentração de lipoproteínas de densidade baixa (LDL, do inglês Low Density Lipoprotein) e elevada (HDL, do inglês High Density Lipoprotein), de Tiroxina, e de Ferro, Zinco, Cálcio, Vitamina A e Vitamina E, aumento da concentração de Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH, do inglês AdrenoCorticoTropic Hormone) e de Cortisol, e o aparecimento de alterações metabólicas como lipólise, gluconeogénese e catabolismo muscular (Cerón et al., 2005; Gruys et al., 2005; Cray et al., 2009).

Um outro efeito também particularmente importante, é a modulação do padrão de síntese proteica a nível hepático, a qual resulta na alteração das concentrações plasmáticas de determinadas proteínas, designadas de Proteínas de Fase Aguda (PFAs). A maioria das PFAs, são consideradas PFAs positivas já que as suas concentrações aumentam durante o processo inflamatório. No entanto, também existem as PFAs negativas, cujas concentrações diminuem durante esta fase (Cerón et al., 2005; Gruys et al., 2005; Paltrinieri, 2007; Cray et al., 2009). Esta modulação hepática resulta do efeito sinérgico das citocinas anteriormente mencionadas. O TNF- $\alpha$  induz proteólise periférica, aumentando o fluxo de aminoácidos para o fígado; a IL-1 inibe a síntese de PFAs negativas, promove a síntese de glucocorticóides através da activação do eixo hipófise-adrenal e em conjunto com estes promove a produção de PFAs positivas; e a IL-6 induz a libertação de PFAs positivas presentes ao nível dos hepatócitos, e

inibe a produção de IL-1 e TNF- $\alpha$  por parte do sistema mononuclear-fagocitário, equilibrando assim a intensidade que a RFA pode atingir (Gruys et al., 2005; Paltrinieri, 2007). Esta regulação da RFA também ocorre através da rápida remoção das citocinas em circulação pelo fígado; da libertação de Interleucina-10 (IL-10) pelas células de Kupffer que suprimem a produção local de IL-6; da inibição de determinados componentes da RFA a nível hepático pela acção de IL-1 e Interleucina-4 (IL-4); e pelo facto de algumas PFAs actuarem como moduladoras na produção de citocinas (Cerón et al., 2005; Gruys et al., 2005).

Figura 1 - Ilustração simplificada da Resposta de fase aguda, segundo: Cray et al. (2009).  
Acute phase response in animals: A review. Comparative Medicine, 59(6):517-526.



## 2.1. Proteínas de Fase Aguda (PFAs)

As PFAs apresentam como funções: 1) opsonizar microorganismos e activar o sistema complemento, 2) captar radicais livres e resíduos celulares, e 3) neutralizar a acção de enzimas proteolíticas (Guys et al., 2005; Paltrinieri, 2007).

As PFAs são classificadas em positivas ou negativas, de acordo com o facto de sofrerem aumentos ou diminuições nas suas concentrações, respectivamente. A principal PFA negativa, é a Albumina, a proteína sérica mais abundante a nível sanguíneo constituída por grandes quantidades de aminoácidos. Durante a RFA, a diminuição da síntese de Albumina, resulta num aumento de aminoácidos disponíveis para a produção de um conjunto de PFAs positivas. Outras proteínas como a Proteína Ligante de Retinol (do inglês *Retinol Binding Protein* - RBP), Proteína Ligante de Cortisol (do inglês *Cortisol Binding Protein* - CBP), Transtirretina (TTR) e Transferrina, também são consideradas PFAs negativas, e actuam no transporte de hormonas e vitaminas. Quando os níveis destas proteínas diminuem, a maioria das hormonas e vitaminas são libertadas na circulação sob forma livre, ou seja, biologicamente activas, permitindo assim que o organismo as utilize de forma melhor, sem ter que aumentar a sua produção (Cerón et al., 2005; Gruys et al., 2005; Paltrinieri, 2007; Cray et al., 2009).

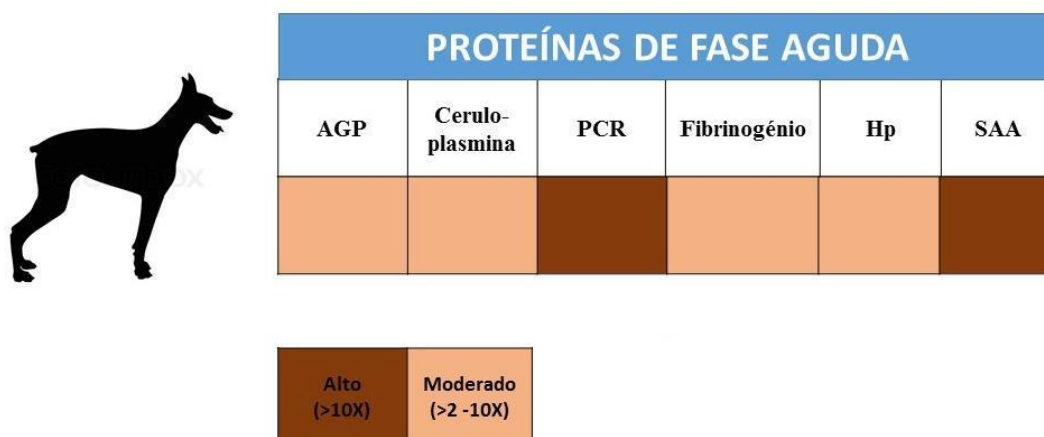
No que respeita ao grupo das PFAs positivas, ele é constituído pela Proteína C-Reactiva (PCR), certos componentes do sistema complemento como o C3 e o C4, pela  $\alpha$ 1-Glicoproteína Ácida (AGP); pela Proteína Ligante de LPS (do inglês *LPS Binding Protein* - LBP); pela Haptoglobina (Hp); pela Ceruloplasmina (Cp); pela proteína Amilóide A Sérica (SAA, do inglês *Serum Amyloid A*); por Fibrinogénio e outras tantas proteínas com actividade anti-proteolítica como a  $\alpha$ 1-Antitripsina (Cerón et al., 2005; Gruys et al., 2005; Paltrinieri, 2007; Cray et al., 2009) (Figura 2).

Dependendo do grau de elevação que as suas concentrações sofrem relativamente aos seus valores basais, as PFAs positivas podem ser classificadas em: 1) PFAs de aumento acentuado (as concentrações aumentam 10-100 vezes); 2) PFAs de aumento moderado (concentrações aumentam 2-10 vezes); e 3) PFAs de aumento ligeiro (Cray et al., 2009).

As PFAs de aumento acentuado, tendem a aumentar significativamente as suas concentrações nas primeiras 48 horas após o estímulo inflamatório, diminuindo rapidamente devido ao seu reduzido tempo de semi-vida. As PFAs de aumento moderado e ligeiro, podem aumentar mais lentamente e permanecer assim durante um período mais prolongado, sendo por isso observadas mais frequentemente em processos inflamatórios crónicos (Cray et al., 2009).



Figura 2 - Ilustração do aumento das concentrações das proteínas de fase aguda no cão face a uma agressão ao organismo, segundo: Tizard, I.(2013). Veterinary Immunology. Chapter 6 - Systemic Response to Inflammation:54.



## 2.2. Aplicação das PFAs na prática clínica

De um ponto de vista clínico, a RFA tem 3 características: 1) é uma resposta muito rápida, que se desenvolve antes do aparecimento de respostas imunitárias específicas, e em muitos casos, antes da instalação de sinais clínicos; 2) apresenta uma especificidade muito baixa; 3) a produção e resposta das PFAs varia dependendo da espécie em questão. Por exemplo, no cão, observa-se uma forte resposta de PCR, contrariamente ao que se regista no gato (Cerón et al., 2005).

No cão, as PFAs de aumento acentuado (PCR e SAA) encontram-se mais elevadas em casos de inflamação, podendo ser utilizadas como uma ferramenta de monitorização e indicador de prognóstico. Por exemplo, os níveis séricos de PCR e de AGP aumentam numa fase pré-sintomática em casos de Erliquiose e Leishmaniose, e diminuem rapidamente após boa resposta à terapêutica (independentemente do tipo de doença), ou permanecem elevadas em casos de pouca eficácia do tratamento (Paltrinieri, 2007).

Contudo, o uso das PFAs na monitorização do curso clínico e terapêutica de uma doença apresenta algumas limitações, por exemplo, mesmo em caso de doença, as PFAs podem apresentar valores séricos dentro dos intervalos de referência, pelo que o seu uso na monitorização clínica pode ser reduzido (Cerón et al., 2005). Também vale a pena referir que os níveis séricos de PFAs podem ser influenciados por diferentes factores como: vacinação; terapia com corticosteróides ou barbitúricos, ou mesmo por uma condição de gestação. Logo é possível que nestas situações se observem “falsos” aumentos nas concentrações de PFAs (Paltrinieri, 2007).

### 3. Proteína C-Reactiva (PCR)

A Proteína C-Reactiva (PCR) foi a primeira PFA a ser descrita. Pertence à família das Pentraxinas, apresenta um peso molecular de 100 kDa e uma estrutura pentamérica com duas faces, uma que se liga à fosfocolina (molécula presente em todas as membranas celulares, incluindo bactérias e protozoários), e a outra face liga-se a receptores presentes na superfície de neutrófilos, e que são receptores de ligação à região FC de anticorpos, como o FC $\gamma$ RI e FC $\gamma$ RII (do inglês *Fc-gamma receptor*). A PCR consegue ligar-se a polissacarídeos e a glicolípidos bacterianos e de células lesadas, activando o sistema de complemento através da via clássica. Assim, a PCR actua como uma opsonina, promovendo a fagocitose e remoção de microorganismos, e de células lesadas ou mortas. (Eckersall & Conner, 1988; Cerón et al., 2005; Cray et al., 2009; Tizard, 2013). Apesar de apresentar uma actividade pró-inflamatória, a PCR também possui efeitos anti-inflamatórios, já que inibe a desgranulação de neutrófilos e a produção de superóxido, bloqueando também o fenómeno de agregação plaquetária, e promovendo a regeneração dos tecidos lesionados através da capacidade de redução de lesão derivada do processo inflamatório (Tizard, 2013).

No cão, os aumentos do nível sérico da concentração da PCR já foi observado em condições de doença tão precocemente como 4 horas após o estímulo de lesão tecidular, atingindo picos de concentração até 100 vezes superiores ao seu valor basal, 24-48 horas pós-estímulo, diminuindo posteriormente de uma forma rápida se a causa subjacente for resolvida (Caspi et al., 1984; Eckersall & Conner, 1988; Nakamura et al., 2008; Cray et al., 2009).

A PCR pode ser determinada através de métodos como: Imunodifusão; Electro-Imuno-Ensaio; Ensaio ImunoFluorimetrico de Tempo Resolvido (do inglês *Time-Resolved ImmunoFluoriMetric Assay* - TR-IFMA); Aglutinação Passiva Reversa em Látex (do inglês *Reverse Passive Latex Agglutination* - RPLA); Ensaio ImunoAbsorvente Associado a Enzima (do inglês *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* – ELISA); e Imunoturbidimetria (Eckersall, Conner & Harvie, 1991; Yamamoto et al., 1994; Tagata et al., 1996; Kjelgaard-Hansen, Jensen & Kristensen, 2003; Kjelgaard-Hansen, Kristensen & Jensen, 2003; Hillström, Hagman, Tvedten & Kjelgaard-Hansen, 2014; Alberto, Asta, Damián, Silvia & José, 2017).

A maioria destes métodos utiliza soro ou plasma como amostra para análise, no entanto o método de TR-IFMA pode utilizar sangue, saliva ou derrames cavitários (Parra, Tecles, Martínez-Subiela & Cerón, 2005; Parra, Tuomola, Cabezas-Herrera & Cerón, 2005; Parra, Papasouliotis & Cerón, 2006; Cray et al., 2009). A PCR canina mantém-se estável durante 3 meses quando conservada a uma temperatura de -10°C. Dillman e Coles (1966), demonstraram que a PCR canina se mantém estável durante 2 meses a uma temperatura de -20°C, sendo inactivada em 30 minutos a uma temperatura de 70°C (Cerón et al., 2005).

É importante referir que a presença de hemólise, lipémia ou bilirrubinémia influencia a concentração de PCR na amostra. Por exemplo, através do método de ELISA, a PCR encontra-se aumentada em casos amostras hemolisadas e lipémicas, e diminuída em casos de amostras ictéricas (Martínez-Subiela & Cerón, 2005). Contudo, estas alterações são de pequena intensidade, pelo que não têm impacto a nível da prática clínica. Através do método de Imunoturbidimetria, verifica-se uma diminuição de 90% dos níveis séricos de PCR das amostras hemolisadas, o que poderá dever-se ao grau de absorção causado por grandes quantidades de hemoglobina presente (Eckersall et al., 1991). Com o método de TR-IFMA, não são observadas alterações causadas por hemólise de amostras (Cerón et al., 2005).

### **3.1. A Influência de Factores Biológicos na Concentração Sérica de PCR**

Vários são os parâmetros biológicos responsáveis pela variação das concentrações séricas de PCR, destacando: a idade, a raça, gestação e ambiente.

Em animais saudáveis, não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de PCR relacionadas com a idade (Yamamoto et al., 1994; Kuribayashi et al., 2003), contrariamente ao que se observou em situações inflamatórias, onde se observam maior concentrações de PCR mais elevados em indivíduos cujas idades compreendidas entre os 3 e os 18 meses de idade, comparativamente a cães com apenas 1 mês de idade (Hayashi et al., 2001).

Quanto ao factor raça, um estudo por Wong et al (2011) evidenciou que em cães Schnauzer Miniatura saudáveis, os níveis médios de PCR sérica, são ligeiramente mas de modo significativo mais elevados do que em indivíduos de outras raças.

De acordo com Kuribayashi et al., 2003, não existem variações entre géneros, mas o facto de a fêmea estar ou não gestante, vai associar-se a um aumento da concentração de PCR, mais especificamente durante o período de implantação embrionária e do desenvolvimento placentário, resultante de inflamação provocada pela invasão que o endométrio materno sofre. Similarmente ao que acontece no Homem, a PCR canina não parece possuir um ritmo circadiano (Otabe et al., 1998). Contudo, cães que vivem no exterior apresentam maiores níveis de PCR do que os mantidos em casa, o que poderá resultar de factores ambientais capazes de estimular mais o sistema imunitário (Cerón et al., 2005). Por fim, é sabido que os valores de PCR não são influenciados pelo maneio continuado do indivíduo, pelas colheitas biológicas repetidas, pela realização de injeções subcutâneas, pela administração de soro fisiológico, ou mesmo de fármacos como glucocorticóides ou inibidores de prostaglandinas (Otabe et al., 1998; Cerón et al., 2005).

### **3.2. Comparação entre a PCR e outros Marcadores Inflamatórios**

Apesar de fraca, já foi encontrada uma relação entre a PCR e número de leucócitos e neutrófilos, em particular, sendo maior a concentração de PCR quanto maior o número de leucócitos e de granulócitos (Cerón et al., 2005; Nakamura et al., 2008).

Isto é importante já que, em relação às contagens leucocitárias, a PCR: 1) apresenta maior sensibilidade em termos de diagnóstico, conseguindo mesmo detectar estados inflamatórios, em animais cuja medula óssea não é capaz de responder adequadamente a um estímulo inflamatório devido a uma situação de mielossupressão; 2) é mais estável do que os componentes celulares do sangue, podendo por isso ser analisada em amostras de soro ou plasma congelados; e 3) demonstra uma resposta mais rápida do que as contagens de leucócitos, já que estes têm que ser produzidos na medula óssea (Cerón et al., 2005; Christensen, Eriksen & Kjelgaard-Hansen, 2015).

Num cenário peri-operativo, a PCR também pode funcionar como uma boa ferramenta de monitorização do grau de inflamação tecidular, verificando-se que o grau de elevação da sua concentração se relaciona com a intensidade do traumatismo cirúrgico ao que o doente foi exposto, estando mais elevada em procedimentos como cirurgias ortopédicas (Yamamoto et al., 1993). Também foi possível verificar que após todos os procedimentos cirúrgicos, as concentrações de PCR diminuíram significativamente no momento de remoção da sutura e do desaparecimento dos sinais clínicos, enquanto que a contagem de leucócitos ainda se mantinha aumentadas. (Yamamoto et al., 1993; Cerón et al., 2005; Cray et al., 2009).

#### **4. O Laser Cirúrgico de Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>): Produção e Caracterização**

A compreensão do funcionamento do equipamento cirúrgico de laser de CO<sub>2</sub>, exige que se conheça um pouco sobre o processo através do qual se produz o efeito LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*). A produção de luz por um átomo, está relacionada com os seus níveis energéticos. Ao absorverem uma fonte energética, os átomos transitam de um estado energético basal, para um estado excitado, ou seja, para um nível energético mais elevado. Quando o processo é invertido, isto é, quando o átomo volta ao seu nível energético basal, ocorre uma emissão espontânea de energia sob a forma de um fóton com uma determinada energia. No entanto, se o átomo já se encontrar num estado energético superior ao basal, e nesse momento for atingido por outro fóton, serão emitidos 2 fótons em fase e com o mesmo comprimento de onda, à medida que o átomo decai para o seu estado energético basal. A este processo designamos uma emissão estimulada de fótons. Assim sendo, quando uma população de átomos é excitada a um nível de energia superior seguido de estimulação com energia em forma de luz, o resultado é uma emissão estimulada de fótons em massa criando o efeito de LASER. Este efeito só é possível se este conjunto de átomos se encontrar num estado de inversão de população, ou seja, quando o número de átomos em estados energéticos mais elevados se sobrepõe ao número de átomos com níveis de energia mais baixos, o que para tal é necessário que exista um fornecimento de energia constante ao sistema em questão (Wright, 1982). A radiação que constitui o laser apresenta 3 características particulares: 1) é coerente, ou seja, todas as ondas electromagnéticas estão em fase tanto espacial como temporalmente; 2) é altamente colimada, sendo que todas as ondas se encontram quase paralelas entre elas; e 3) é monocromática, uma vez que todas as ondas apresentam o mesmo comprimento de onda (Wright, 1982).

Actualmente existem 2 principais tipos de equipamentos de laser de CO<sub>2</sub> comercializados em Medicina Veterinária. O primeiro, consiste num sistema clássico de laser de CO<sub>2</sub> constituído por um braço articulado, contendo espelhos internos que reflectem a energia do laser para uma peça de uso manual, que por sua vez irá focar toda a energia para um ponto-alvo através de uma lente. O segundo tipo de equipamento, mais moderno, é constituído por uma guia flexível que irá transmitir a energia do laser para uma peça em forma lápis, a qual por sua vez irá focar a energia do laser sobre os tecidos (Bartels, 2002; Palmer, 2002) (Figuras 3 e 4). Basicamente, nestes equipamentos, o gás de CO<sub>2</sub> é sujeito a uma corrente eléctrica transitando estas moléculas para um estado energético excitado, e resultando num processo de inversão de população. Finalmente, através da continuada exposição de energia sobre as moléculas de CO<sub>2</sub> em estado excitado, ocorre a já referida emissão estimulada de fótons produzindo o laser de CO<sub>2</sub> (Wright, 1982; Bartels, 2002; Dye, Teague, Ostwald & Ferreira,

2002).

O comprimento de onda e frequência da luz do laser determinam a sua cor e a forma como interage com uma superfície-alvo. Quando a luz do laser atinge uma superfície, esta pode ser reflectida, absorvida, dispersada ou transmitida. Quando é absorvida por um tecido-alvo, pode ser convertido em um ou mais, dos seguintes tipos de energia: térmica, química ou acústica (Holt e Mann, 2002; Carreira & Azevedo, 2016).

O laser de CO<sub>2</sub> é composto por radiação com um comprimento de onda de 10600 nm, pertencendo à zona infravermelha do espectro electromagnético (não é visível pelo olho humano). Este comprimento de onda é altamente absorvido pela água, seguido de outras moléculas como a hemoglobina, a melanina e outras proteínas, resultando numa interacção fototérmica entre o laser e o tecido. O elevado grau de absorção do laser de CO<sub>2</sub> pela água, permite um corte preciso dos tecidos, via vaporização dos fluídos intra e extracelulares, juntamente com a destruição da membrana celular (Fisher, Frame, Browne & Tranter, 1983; Wilder-Smith, Arrastia, Liaw & Berns, 1995; Dye et al., 2002; Bartels, 2002; Shelley, 2002; Palmer, 2002; Paczuska et al., 2014; Carreira & Azevedo, 2016; Carreira, Ramalho, Nielsen & Azevedo, 2017). Esta interacção fototérmica produz vários efeitos à medida que a temperatura dos tecidos aumenta. Ao atingir: entre 42-45°C, ocorre destruição dos vasos sanguíneos resultando em necrose tecidular; entre 50-100°C ocorre coagulação, e as proteínas são desnaturadas levando a lesão tecidular irreversível; uma vez que atinja temperaturas superiores a 100°C ocorre vaporização dos tecidos (Holt e Mann, 2002; Palmer, 2002).

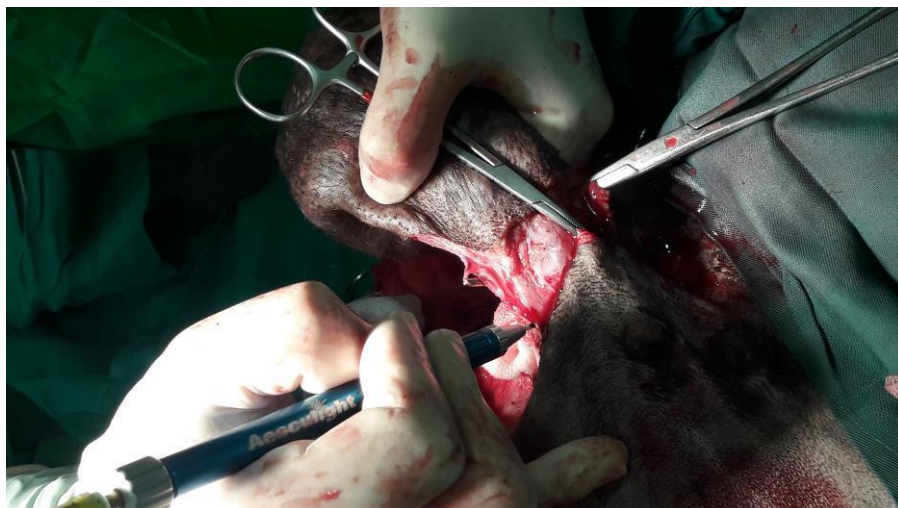
No entanto se ocorrer um sobreaquecimento do tecido que tenha sofrido uma vaporização incompleta, irá resultar na carbonização do mesmo, mas este continuará a absorver energia do laser, convertendo-a em energia térmica, que será por sua vez transmitida aos tecidos adjacentes, resultando em lesão tecidular colateral (Holt e Mann, 2002).

Os efeitos gerais do laser em tecidos moles estão correlacionados com a densidade de potência libertada, sendo que esta é determinada pela potência (Watts) dividida pela área de libertação do laser (cm<sup>2</sup>). A densidade de potência utilizada é um factor que influencia a lesão térmica causada às estruturas adjacentes, sendo que em relação ao laser de CO<sub>2</sub>, a zona de lesão térmica em tecidos moles após incisão, é em média menor que 0,6 mm (Wilder-Smith et al., 1995; Paczuska et al., 2014).

*Figura 3 - Fotografia original do sistema de Laser de CO2 cirúrgico - modelo Aesculight 1507 Surgical Laser System, patrocinado pela Aesculight® e utilizado na realização do estudo da presente tese subordinado ao tema: “Comparação da variação dos valores séricos de Proteína C-Reactiva (PCR) entre cirurgia com laser de dióxido de carbono (CO2) e cirurgia com lâmina de bisturi, nos períodos pré- e pós-cirúrgicos em doentes da espécie Canis familiaris” (Carreira, 2018).*



Figura 4 - Fotografia original de um procedimento de exérese de massa oncológica utilizando o sistema de Laser de CO2 cirúrgico - Aesculight 1507 Surgical Laser System, patrocinado pela Aesculight® (Carreira, 2018).



#### **4.1. As Vantagens e Desvantagens do Laser de CO2**

Em relação à lâmina de bisturi, o laser de CO2 apresenta várias vantagens: 1) uma capacidade de efectuar incisões precisas com pontos focais que variam de 0,1-0,3 mm; 2) é capaz de laquear rapidamente vasos sanguíneos (com diâmetro <0,6 mm) e vasos linfáticos, reduzindo deste modo a hemorragia intra-cirúrgica e o edema pós-cirúrgico; 3) consegue selar as terminações nervosas, diminuindo a dor pós-operatória; 4) reduz o tempo de cirurgia; 5) produz um efeito anti-séptico ao vaporizar os microorganismos atingidos pelo feixe de laser; 6) em cirurgias oncológicas, é capaz de diminuir o grau de contaminação intra-operatória da ferida cirúrgica com células tumorais, já que o laser funciona sem haver contacto directo com os tecidos (Wilder-Smith et al., 1995; Davidson et al., 2001; Dye et al, 2002; Holt & Mann, 2002; Palmer, 2002; Shelley, 2002; Dunié-Mérigot, Bouvy & Poncet, 2010; Paczuska et al., 2014; Carreira e Azevedo, 2016; Carreira et al., 2017).

Num estudo por Carreira et al. (2017), evidenciou-se que incisões de pele efectuadas por laser de CO2 estão associadas a menores valores da pressão arterial (sistólicos, diastólicos e médios), relativamente aos valores verificados em incisões feitas por lâmina de bisturi. Estes resultados podem ser explicados pela menor estimulação do sistema nociceptivo, diminuindo a percepção de dor e actividade do sistema nervoso autónomo, estabilizando a hemodinâmica do paciente. Como resultado, o uso do laser de CO2 está associado à redução do consumo de anestésico volátil intra-cirúrgico, diminuindo assim possíveis efeitos secundários derivados da anestesia e aumentando a segurança para o paciente.

Pelas razões já referidas, o uso do laser de CO2 relativamente à lâmina de bisturi, resulta numa resposta inflamatória reduzida dos tecidos lesionados, pelo que a cicatrização da ferida cirúrgica tenderá a ocorrer de forma mais rápida. Para além disso, ao induzir um traumatismo tecidular mínimo, as paredes endoteliais dos vasos são menos lesadas, o que diminui o extravasamento de proteínas como a Albumina, promovendo assim uma cicatrização mais rápida (Carreira & Azevedo, 2016).

Em 2016, Carreira e Azevedo, num estudo comparativo entre laser de CO2 e lâmina de bisturi, verificou-se uma diferença significativa no que diz respeito à estética da cicatriz resultante, em que a totalidade dos doentes (100%) submetidos a cirurgia com laser de CO2 apresentavam uma classificação de “muito boa” quanto ao aspecto final da cicatriz, enquanto os submetidos à lâmina de bisturi apenas 28,5% dos casos receberam esta classificação.

Quanto às desvantagens associadas ao equipamento cirúrgico de laser de CO2, destaca-se: 1) os custos elevados do equipamento; 2) a necessidade de treino por parte do cirurgião; e 3) o controlo dos perigos associados ao seu uso, os quais incluem possíveis lesões causadas pelo



laser em pele desprotegida ou córnea; possível reflexão do feixe de laser CO<sub>2</sub> quando este contacta com materiais ou superfícies reflectoras; o tubo endotraqueal e o oxigénio nele contido podem entrar em combustão por acção do laser; queimadura dos tecidos; e ainda a contaminação por via aérea através dos vapores formados pela interacção laser-tecido. Também existe a necessidade de equipar o bloco cirúrgico com dispositivos suplementares (como o extractor de fumos) para assegurar a segurança do cirurgião (Wright, 1982; Dye et al., 2002; Holt & Mann, 2002; Carreira & Azevedo, 2016; Carreira et al., 2017).

#### **4.2. A Aplicação do Laser de CO<sub>2</sub> nas Diferentes Áreas Cirúrgicas**

O uso do laser de CO<sub>2</sub> pode ser aplicado em diferentes áreas cirúrgicas. Considerando que a pele representa um tecido com elevado conteúdo em água e uma boa vascularização, ele assume-se como um excelente tecido-alvo para a energia produzida pelo laser de CO<sub>2</sub>, existindo uma elevada absorção, pelo que o grau de lesão térmica lateral à linha de incisão é mínimo. A natureza de um corte sem contacto vai resultar em menores efeitos de distorção, e por isso em incisões mais precisas (Holt e Mann, 2002; Carreira & Azevedo, 2016).

Em oncologia, é possível que ocorram recidivas por contaminação do tecido saudável por células tumorais, através do contacto com instrumentos cirúrgicos ou através da hemorragia associada ao processo de excisão. Com o uso do laser de CO<sub>2</sub> a probabilidade de ocorrência deste processo é diminuída, já que o corte efectuado é sem contacto pelo instrumento de laser; e ao efectuar a excisão do tecido tumoral, é criada uma barreira de vaporização entre este e o restante tecido saudável, à qual se associa a grande capacidade de controlo da hemorragia cirúrgica. Além disso, a uma melhor hemóstase associa-se uma melhor visualização das margens de excisão, permitindo ao cirurgião criar margens mais curtas mantendo a remoção completa histologicamente (Lanzafame et al., 1986; Lanzafame et al., 1988; Holt e Mann, 2002; Palmer, 2002; Paczuska et al., 2014).

Na Otorrinolaringologia, as cirurgias são na sua maioria cruentas, resultando em maior dor e edema pós-operatório. Através do laser de CO<sub>2</sub>, os vasos sanguíneos são mais facilmente laqueados, juntamente com terminações nervosas, resultando em menor nível de hemorragia, edema e dor pós-cirúrgica. Também ao minimizar a hemorragia intra-cirúrgica a necessidade do uso de suturas também se reduz, o que diminui drasticamente o edema pós-cirúrgico comparativamente à cirurgia convencional (Clark & Sinibaldi, 1994; Davidson et al. 2001; Dye et al., 2002; Holt e Mann, 2002; Dunié-Mérigot et al., 2010).

Na Gastroenterologia, o laser de CO<sub>2</sub> é bastante eficaz devido à elevada vascularização e conteúdo em água do tracto gastrointestinal. As aplicações a nível gastrointestinal incluem incisão e aproximação, excisão, ablação, ou fusão de tecidos. É importante mencionar que é

necessário algum cuidado com o uso do laser CO<sub>2</sub> no tracto gastrointestinal devido à presença de gases inflamáveis, como o metano (Holt e Mann, 2002).

No que respeita a procedimentos cirúrgicos na cavidade oral, o laser de CO<sub>2</sub> é muito útil excepto se o procedimento envolver osteotomias, já que o osso apresenta uma reduzida composição em água, e um elevado nível mineral, pelo que provoca uma vaporização incompleta do tecido que por sua vez vai carbonizar por continuada exposição ao laser (Abt et al., 1987; Debias et al., 1994; Holt e Mann, 2002).

Em outras situações neoplásicas da cavidade oral como melanoma, fibrossarcoma, e carcinoma das células escamosas, pode existir dificuldade no encerramento da boca e a indicação para uma excisão completa da massa tumoral pode ser impossível. Nestes casos, o uso do laser de CO<sub>2</sub> permite uma citoredução do tecido neoplásico, podendo ainda fazer parte de um protocolo terapêutico paliativo, ou como complemento de outras terapêuticas, como radioterapia ou quimioterapia (Holt e Mann, 2002).

Em intervenções cirúrgicas do aparelho urinário, como cistotomias, a incisão da parede da bexiga pode ser efectuada sem grande probabilidade de ocorrer lesão térmica de outras porções da parede da bexiga através de laser que atravesse o seu lúmen, já que a urina absorve o excesso de energia proveniente do laser. Incisões da parede da bexiga através de laser, resultam em menores hemorragias, permitindo uma melhor visualização da mucosa (Lobik et al., 1999; Holt e Mann, 2002).

Em Oftalmologia cirúrgica, o uso do laser de CO<sub>2</sub> apresenta-se para já restrito ao tratamento das pálpebras e estruturas associadas, obtendo bons resultados funcionais e estéticos (Kaplan, Kott & Giler, 1996; Lapid-Gortzak, Lapid, Monos & Lifshitz, 2000; Holt e Mann, 2002).

Na área de Ortopedia, o laser de CO<sub>2</sub> embora não seja eficiente em incisões de osso, ele é muito útil para incisões em estruturas como os músculos, a cartilagem ou os ligamentos. E apesar das abordagens cirúrgicas ortopédicas realizadas com laser, tenham um desenvolvimento mais lento em relação aos métodos convencionais, elas resultam numa melhor hemóstase e exposição do osso. A recuperação pós-cirúrgica será assim mais rápida, e com menor dor, edema e hemorragia associada. (Rayan, Pitha & Edwards, 1991; Holt e Mann, 2002).

### III - Materiais e Métodos

O presente estudo foi realizado numa amostra de 50 cadelas saudáveis (n=50) sujeitas a cirurgia do tipo Ovariohisterectomia (OVH) electiva, e que apresentaram os seguintes critérios de inclusão: 1) estado clínico geral hígido, 2) análises pré-cirúrgicas (hemograma, função hepática, função renal, electrólitos) com os valores dentro dos limites de referência, 3) sem qualquer tipo de terapêutica em decurso, 4) uma condição corporal de grau 4 ou 5 segundo a escala de avaliação corporal de Laflamme (1997), e 5) o consentimento informado assinado pelos cuidadores para a participação no estudo.

A amostra foi aleatoriamente dividida em 2 grupos cada um com 25 indivíduos, de acordo com o tipo de técnica utilizada para a incisão durante o procedimento cirúrgico, nomeadamente: incisão com lâmina de Bisturi (grupo B – GB), ou incisão com Laser de CO2 (grupo L - GL). Nas doentes de GB as incisões foram realizadas com uma lâmina de bisturi nº 24; e nas doentes de GL as incisões foram realizadas com o Sistema de Laser de CO2 Cirúrgico - Aesculight 1507 Surgical Laser System, patrocinado pela Aesculight®, com a selecção do programa Superpulso, um foco de 0,4 cm<sup>2</sup> e uma potência de 12 Watts (W) ou de 15 W.

Cada doente foi sujeita a cateterização periférica ao nível da veia cefálica após a aplicação prévia tópica de Benzocaína em gel. De seguida, foi instituído para todas o mesmo protocolo terapêutico pré-cirúrgico que considerou: Amoxicilina + Ácido Clavulânico (10 mg/kg); Carprofeno (4 mg/kg); Buprenorfina (0,005 mg/kg); Acepromazina (0,005 mg/kg) e fluidoterapia com NaCl0,9% (2 ml/kg/hora). Para a indução anestésica utilizou-se Propofol (4 mg/kg), seguindo-se a manutenção com Isoflurano.

Todas as doentes foram sujeitas a duas colheitas de sangue periférico de um volume de 1 ml cada, e utilizando para tal a veia cateterizada previamente. A colheita foi realizada em 2 tempos diferentes: T0 (momento imediato à cateterização) e T1 (4 horas após ter terminado a cirurgia). Na 1ª colheita (T0), o sangue foi dividido para um tubo de EDTA para realização da prova de hemograma; e para um tubo de heparina o qual foi sujeito a centrifugação imediata durante 3 minutos a 9000 rotações por minuto (r.p.m.) para obtenção de plasma, de forma a quantificar de imediato o valor de PCR sérica. A 2ª colheita (T1), foi realizada 4 horas após o fim da cirurgia e no momento de retirar o cateter à doente. A amostra foi centrifugada de igual modo ao realizado em T0, para de seguida ser utilizada na quantificação do valor de PCR sérica. A medição das concentrações de PCR caninca foram realizadas através do método de química seca, utilizando um analisador automático de bioquímicas (FUJI DRI-CHEM 4000i, FUJIFILM, Tóquio, Japão)

Intra-cirurgicamente a monitorização anestésica das doentes foi do tipo multiparamétrica, avaliando os seguintes parâmetros: frequência cardíaca, frequência respiratória, Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM), fracção expirada de dióxido de carbono, saturação em oxigénio, e temperatura esofágica.

A análise estatística foi realizada utilizando os programas informáticos - RStudio e RCommander. A realização do teste de Shapiro-Wilk permitiu avaliar que a maioria das variáveis estudadas não apresentava o pressuposto de normalidade. Assim, para o estudo dos Coeficientes de Correlação entre os diferentes parâmetros utilizou-se o Teste de Spearman; para a análise de diferenças na variação das concentrações de PCR relacionadas com o tipo de técnica de incisão utilizada (bem como outros parâmetros), utilizou-se o Teste t de Student, Teste de Wilcoxon, e um Modelo Linear Misto seguido do Teste Qui-Quadrado de Wald Tipo II. Os resultados obtidos foram considerados estatisticamente significativos para um intervalo de confiança de 95% e para todos os valores de  $p < 0,05$ .

#### IV - Resultados

A análise estatística descritiva dos vários parâmetros estudados, nomeadamente: Idade, Peso, Raça, PCR em T0, PCR em T1, variação ( $\Delta$ ) da concentração de PCR, glóbulos brancos (WBC), e Potência do Sistema de Laser de CO2, para a totalidade da amostra e para cada um dos grupos considerados – GB e GL, está representada na Tabela 1, e ilustrada com os gráficos 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

Tabela 1 - Análise de estatística descritiva dos parâmetros em estudo, considerando o total da amostra e cada grupo em separado (GB e GL).

Parâmetro	Grupo	N	$\bar{x} \pm SD$	Valor de <i>p</i> (Shapiro-Wilk)
				*
Idade (Anos)	TA	50	2,3± 0,5	<0,01
	GB	25	2,6± 0,2	<0,01
	GL	25	2,0± 0,5	<0,01
Peso (Kg)	TA	50	10,7 ± 2,7	0,05
	GB	25	11,1± 6,07	0,26
	GL	25	10,3 ± 5,9	0,34
Raça		12	Pura	-
	GS			
		13	Indeterminada	-
		11	Pura	-
	GL			
		14	Indeterminada	-
PCR em T0 (mg/dl)	TA	50	1,3± 0,9	<0,01
	GB	25	1,1± 0,9	<0,01
	GL	25	1,5± 0,8	<0,01
PCR em T1 (mg/dl)	TA	50	1,3± 0,9	<0,01
	GB	25	1,3± 1,0	<0,01
	GL	25	1,3± 0,7	<0,01

<b><math>\Delta</math>PCR (mg/dl)</b>	TA	50	$0,01 \pm 0,6$	0,01
	GB	25	$0,2 \pm 0,3$	0,18
	GL	25	$-0,2 \pm 0,8$	0,09
<hr/>				
<b>WBC</b>	TA	50	$9,9 \pm 2,1$	0,58
	GB	25	$10,1 \pm 1,9$	0,50
	GL	25	$9,7 \pm 2,3$	0,14
<hr/>				
<b>Potência do Laser de CO<sub>2</sub> (W)</b>				
	GL	25	$13,2 \pm 1,5$	<0,01

---

*Amostra (N); Média ( $\bar{X}$ ); Desvio Padrão (SD); Proteína C-Reactiva (PCR); Momento pré-cirúrgico (T0); Momento pós-cirúrgico (T1); Variação de PCR entre T0 e T1 ( $\Delta$ PCR); Contagem de leucócitos pré-cirúrgica (WBC); Total da Amostra (TA) ; Grupo Bisturi (GB); Grupo Laser (GL).*

\* Valor de  $p > 0,05$  para normalidade da amostra.

Gráfico 2 – Diagrama de Extremos e Quartis relativo à Idade, para os grupos B e L.

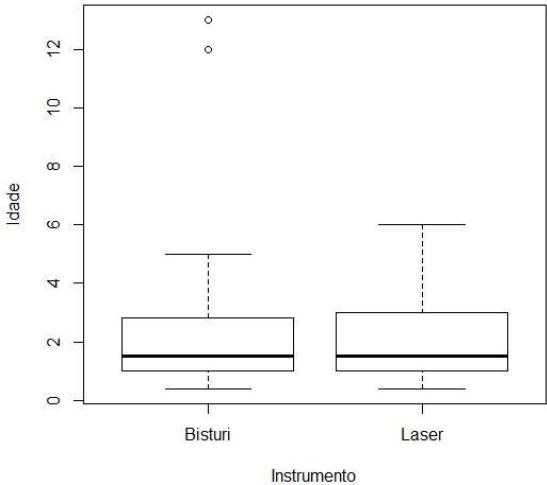


Gráfico 3 – Diagrama de Extremos e Quartis relativo ao Peso, para os grupos B e L.

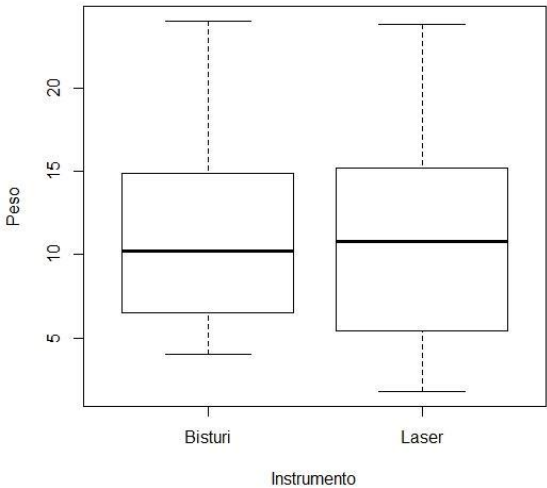


Gráfico 4 – Diagrama de Extremos e Quartis relativo à concentração de PCR no momento T0, para os grupos B e L.

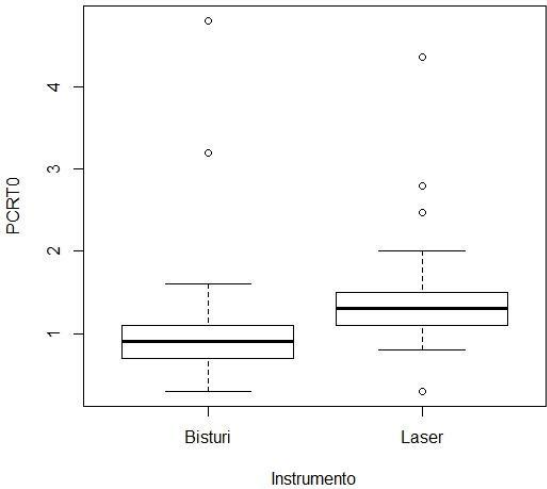


Gráfico 5 – Diagrama de Extremos e Quartis relativo à concentração de PCR no momento T1, para os grupos B e L.

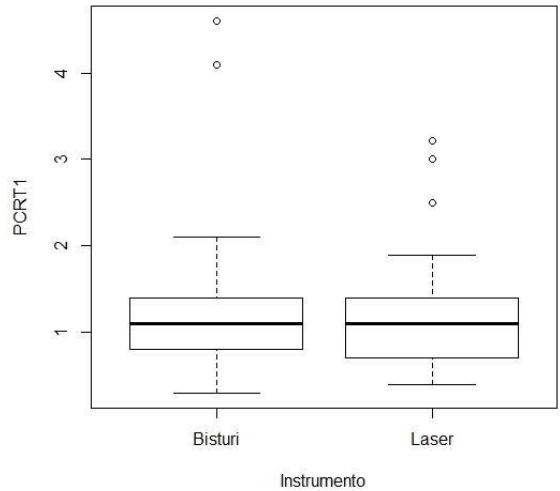


Gráfico 6 – Diagrama de Extremos e Quartis relativo à diferença entre a concentração de PCR em T1 e T0, para os grupos B e L.

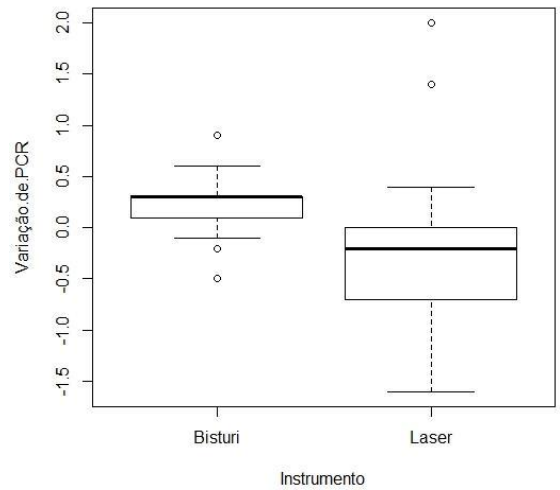
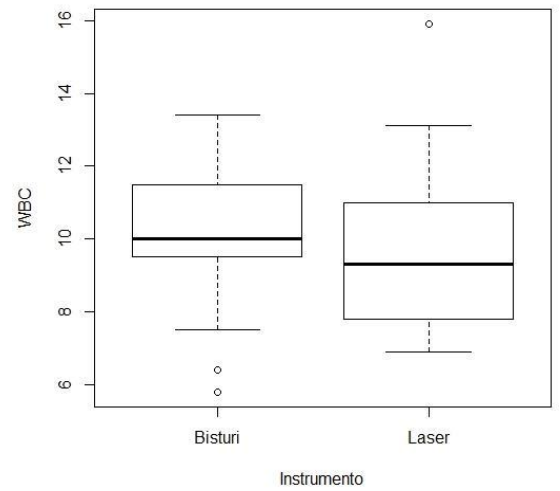


Gráfico 7 – Diagrama de Extremos e Quartis relativo aos WBC, para os grupos B e L.





No que respeita à estatística inferencial, optou-se por analisar individualmente a relação entre a variação da concentração de PCR em função de diferentes parâmetros estudados, nomeadamente: Técnica de Incisão, Idade do doente, Peso do doente, Raça do doente, Potência do Laser de CO2 e contagem de WBC (Tabela 2). Das relações estudadas verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre a variação da PCR em função da técnica cirúrgica utilizada pois  $p < 0,01$ . Foi possível verificar que em T0 o grupo B apresentou uma média de concentração da PCR superior à média de concentração da PCR do grupo L; contudo, em T1 esta situação inverteu-se, observando-se que 4 horas após cirurgia a concentração da PCR do grupo B tendeu a aumentar, enquanto, a concentração de PCR no grupo L tendeu a diminuir (Gráfico 7).

Tabela 2 - Teste de Wald tipo II (Qui Quadrado) da variação da concentração de PCR entre T0 e T1 em função dos diferentes parâmetros estudados: Técnica cirúrgica, Idade do doente, Peso do doente, Raça do doente, Potência do laser de CO2 e contagem de WBC.

		Teste de Wald II (Qui Quadrado)		
Parâmetro		Qui	df	Valor de <i>p</i>
		Quadrado		
ΔPCR	Técnica de Incisão	7,30	1	<0,01*
	Idade	0,40	1	0,55
	Peso	345,90	1	<0,01*
	Raça	0,81	1	0,37
	Potência	0,01	1	0,94
	WBC	0,69	1	0,41

*Variação de PCR entre T0 e T1 ( $\Delta$ PCR); Contagem de leucócitos pré-cirúrgica (WBC); Graus de liberdade (df).*

\* $p < 0,05$  é estatisticamente significativo

Considerando o factor Técnica de Incisão utilizada, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre GB e GL, no que respeita aos parâmetros: Idade do doente ( $p = 0,99$ ), Peso do doente ( $p = 0,63$ ) e contagem de WBC ( $p = 0,48$ ) (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Teste de Wilcoxon da relação entre os parâmetros estudados: Idade do doente, Raça do doente, PCR T0 e Técnica de Incisão.

		Teste de Wilcoxon	
Parâmetro		W	Valor de $p$
Técnica de Incisão (GB vs GL)	Idade	1246	0,99
Raça	PCR T0	296,5	0,79

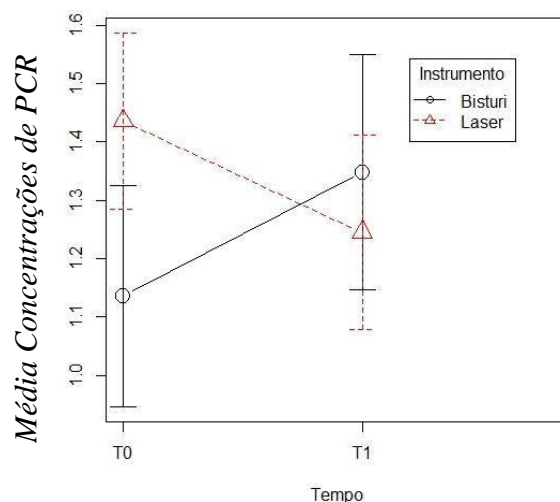
*Grupo Bisturi (GB); Grupo Laser (PCR); Proteína C-Reactiva (PCR); Momento pré-cirúrgico (T0).*

Tabela 4 - Teste T de Welch da relação entre diferentes parâmetros estudados: Peso do doente, contagem de WBC e Técnica de Incisão.

		Teste t de Welch		
Parâmetro		Valor de t	df	Valor de $p$
Técnica de Incisão (GB vs GL)	Peso	0,48	47,74	0,63
	WBC	0,71	46,26	0,48

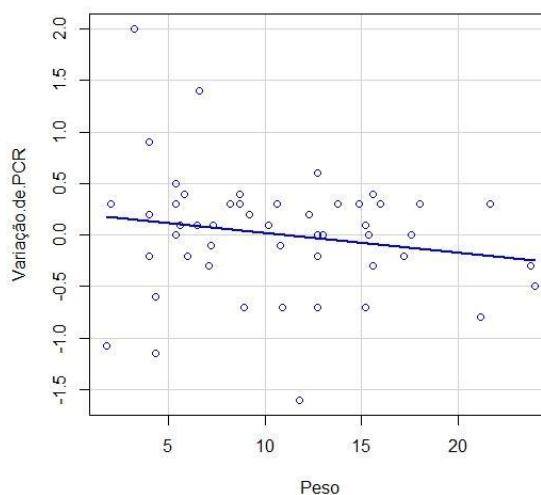
*Grupo Bisturi (GB); Grupo Laser (GL); contagem de leucócitos pré-cirúrgica (WBC); df (graus de liberdade).*

Gráfico 8 – Variação da concentração da PCR em função do tempo (período peri-operatório), de acordo com o tipo de técnica de incisão utilizando: Bisturi ou Laser de CO2.



No que respeita à variação da concentração de PCR em função do Peso do doente, também foi encontrada uma relação estatisticamente significativa pois  $p < 0,01$ , verificando-se que à medida que o peso do indivíduo aumenta, a concentração da PCR tende a diminuir mais em T1 (4 horas após a cirurgia) (Gráfico 8).

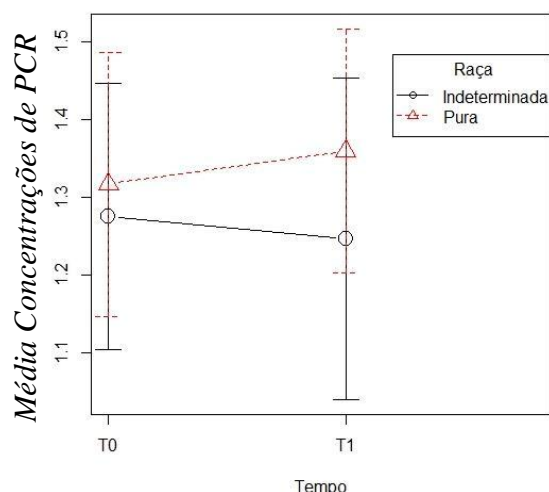
Gráfico 9 – Relação entre a variação da concentração de PCR e o Peso do doente.



Para a relação entre a variação da concentração da PCR e os parâmetros: Idade do doente, Raça do doente, Potência do laser de CO2 e contagem de WBC, não foram obtidos valores estatisticamente significativos, pois  $p=0,55$ ;  $p=0,37$ ;  $p=0,94$  e  $p=0,41$ , respectivamente.

Embora não tenha sido estatisticamente significativo pois  $p = 0,37$ , foi possível observar que a concentração de PCR tendeu a aumentar após a cirurgia em indivíduos de raças puras, e a diminuir nas doentes sem raça determinada (Gráfico 9).

Gráfico 10 - Variação da concentração da PCR ao longo do tempo, em função do tipo de raça dos doentes.



A análise do Coeficiente de Correlação foi realizada entre vários parâmetros (Tabela 5). Apesar de fraca, foi encontrada uma correlação positiva entre a Idade e o Peso ( $p = 0,04$ ;  $Rho = 0,29$ ). Parece existir uma correlação negativa fraca entre o Peso e as concentrações de PCR em T1 ( $p = 0,02$ ;  $Rho = -0,32$ ). Além disso, foi observada uma correlação positiva forte entre a potência do laser utilizada e as concentrações de PCR em T1 ( $p = 0,001$ ;  $Rho = 0,63$ ). Quanto ao teste de Spearman efectuado sobre outros parâmetros, não foram obtidos resultados estatisticamente significativos. (Gráficos 11, 12, 13, 14, 15 e 16).

Tabela 5 - Estudo de Correlação utilizando o Coeficiente de Spearman entre os vários parâmetros estudados: Idade do doente, Peso do doente, PCR T0; PCR T1; contagem de WBC.

Teste de Correlação Spearman		
Parametro	Valor de $p$	Rho
Idade e Peso	0,04*	0,29**
Idade e PCRT0	0,12	0,23
Idade e PCRT1	0,33	0,14
Idade e WBC	0,17	-0,20
Peso e PCRT0	0,16	-0,20
Peso e PCRT1	0,02*	-0,32**
Peso e WBC	0,83	0,03
Potência e PCRT1	<0,01*	0,63**
WBC e PCRT0	0,27	-0,16
WBC e PCRT1	0,96	-0,01

Proteína C-Reactiva (PCR); Momento pré-cirúrgico (T0); Momento pós-cirúrgico (T1); Contagem de leucócitos pré-cirúrgica (WBC). \* $p < 0,05$  é estatisticamente significativo; \*\* $0,0 < Rho < 0,19$  correlação muito fraca;  $0,20 < Rho < 0,39$  correlação fraca;  $0,40 < Rho < 0,59$  correlação moderada;  $0,60 < Rho < 0,79$  correlação forte;  $0,80 < Rho < 1,0$ .

Gráfico 11 – Relação entre a Idade e o Peso.

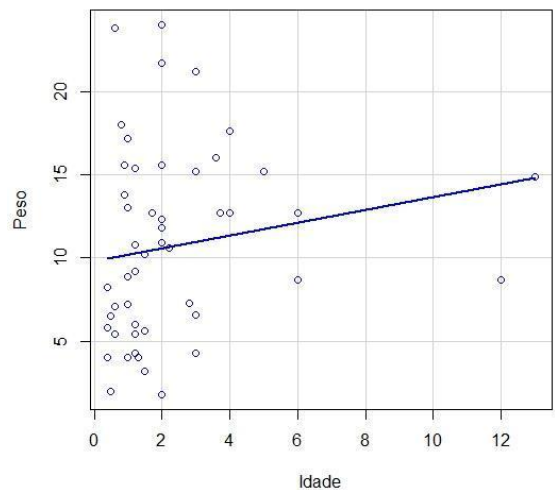


Gráfico 12 – Relação entre a Idade e as concentrações de PCR em T0.

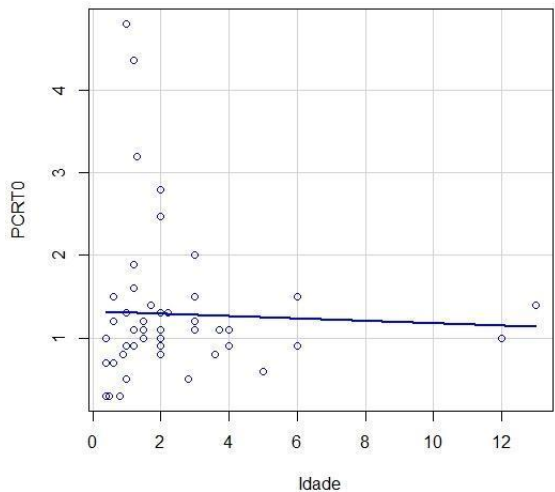


Gráfico 13 – Relação entre a Idade e os WBC.

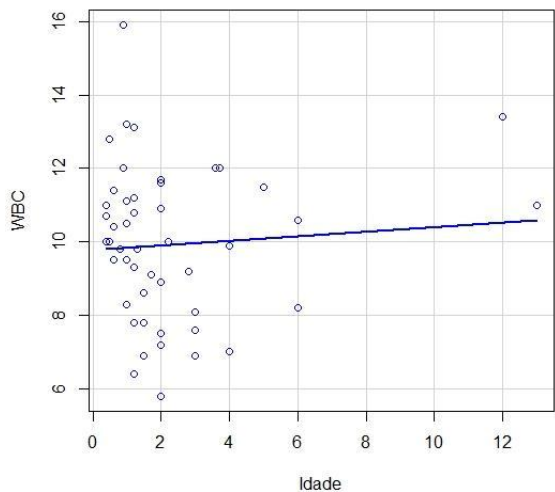


Gráfico 14 – Relação entre o Peso e as concentrações de PCR em T0.

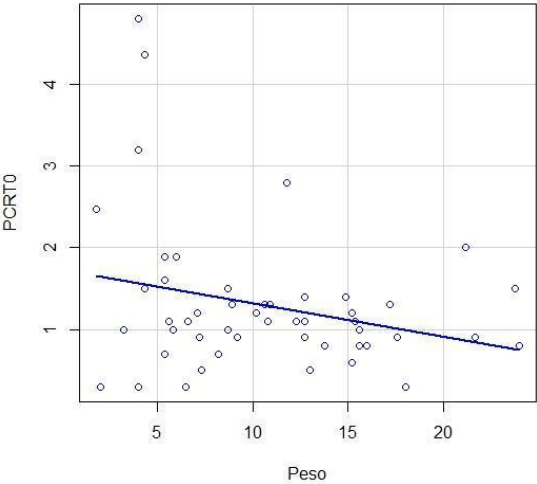


Gráfico 15 – Relação entre o Peso e os WBC.

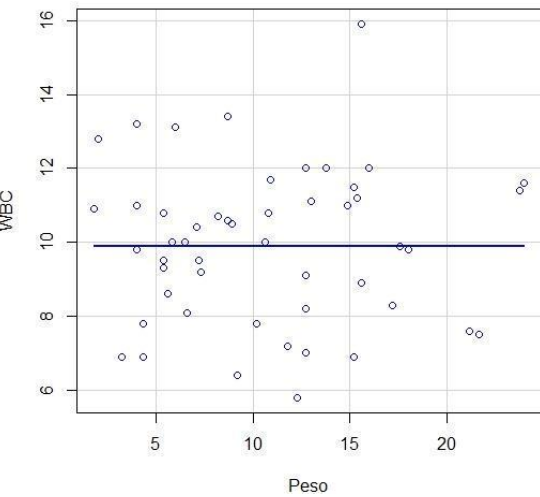
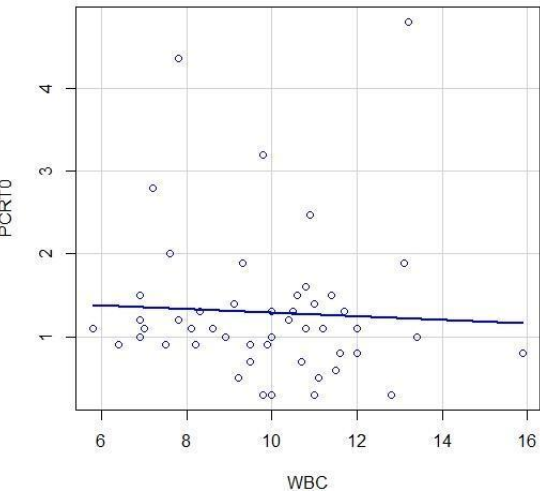


Gráfico 16 – Relação entre os WBC e a concentração de PCR em T0.



## V - Discussão

A PCR canina, é uma PFA positiva cuja concentração sérica pode variar com um conjunto múltiplo de factores, estando presente em situações fisiológicas e patológicas. Em condição de doença, a PCR pode ser observada tão precocemente como cerca de 4 horas após o estímulo de lesão tecidular, atingindo picos de concentração até 100 vezes superiores ao seu valor basal, ao final de um período de 24 - 48 horas pós-estímulo (Caspi et al., 1984; Eckersall & Conner, 1988; Nakamura et al., 2008; Cray et al., 2009).

A sua medição pode ser realizada com recurso a diferentes técnicas. Vários foram os autores que estabeleceram diferentes valores médios da sua concentração em condição fisiológica no cão, variando estes entre os limites de 0,02 mg/dl e 1,60 mg/dl (Eckersall et al., 1989; Yamamoto et al., 1992; Yamamoto et al., 1994; Yamashita et al., 1994; Otabe et al., 1998). De acordo com os resultados do presente estudo, as doentes do total da amostra (TA), e de cada um dos grupos considerados (GB e GL), apresentaram um valor médio da concentração da PCR sérica em T0; ou seja, antes do estímulo cirúrgico, concordante com os valores descritos pelos autores referidos, e muito próximos entre si (TA =  $1,3 \pm 0,9$ ; GB =  $1,1 \pm 0,9$ ; GL =  $1,5 \pm 0,8$ ).

De acordo com o previamente referido e à semelhança de outras PFAs, a síntese da PCR inicia-se quando o organismo é exposto a vários tipos de estímulos agressores que induzem uma reacção inflamatória, como é o caso de situações de traumatismo cirúrgico. Vários estudos realizados em cães, sugerem a necessidade de se incluir a PCR como um marcador da presença de inflamação sistémica pós-cirúrgica, já que as concentrações da PCR se correlacionam directamente com o nível de traumatismo cirúrgico a que o doente é exposto (Yamamoto et al., 1993; Sibanda, Hughes, Pawson, Kelly & Bellenger, 2006; Stedile et al., 2009; Michelsen, Heller, Wills & Noble, 2012). Por esta razão, quanto mais minimalista for o tipo de invasão provocado durante o acto cirúrgico, menor será o traumatismo induzido ao corpo e consequentemente menor a reacção inflamatória desencadeada.

É sabido que o uso do laser de CO<sub>2</sub> em cirurgia se relaciona com uma menor reacção inflamatória, pois caracteriza-se por uma menor hemorragia e edema, e um menor grau de dor para o doente devido à capacidade de provocar a vaporização dos tecidos por onde actua (Romanos et al., 1999; Clark & Sinibaldi, 1994; Dye et al., 2002; Shelley, 2002; Dunié-Mérigot et al., 2010; Paczuska et al., 2014; Carreira & Azevedo, 2016). Além disso, ainda a sua capacidade de laquear vasos sanguíneos de pequeno calibre, vasos linfáticos e nervos periféricos, resultando num melhor controlo dos estímulos pró-inflamatórios causados pelo procedimento cirúrgico desenvolvido (Fisher et al., 1983; Holt & Mann 2002; Bartels, 2002;

Palmer 2002; Carreira et al., 2017).

Assim sendo, seria de esperar que o modo Laser de CO<sub>2</sub> cirúrgico resultasse num menor aumento da concentração de PCR após o procedimento cirúrgico, já que a ele se associam reduzidos estímulos inflamatórios. Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com este pressuposto, já que foi possível encontrar uma diferença estatisticamente significativa na concentração de PCR de acordo com o tipo de técnica de incisão utilizada - lâmina de bisturi e o Laser de CO<sub>2</sub>, pois  $p < 0,01$ . Verificou-se que: 1) no GL a média da concentração da PCR em T1 foi menor comparativamente à média do GB; e que 2) a média da variação da PCR sérica entre T0 e T1 tendeu a ser decrescente para o GL, contrariamente ao registado para GB onde ele foi tendencialmente crescente.

De referir que entre os dois grupos de estudo considerados - GB e GL, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas relativamente aos parâmetros: Idade do doente ( $p = 0,99$ ), Peso do doente ( $p = 0,63$ ) e contagem de WBC ( $p = 0,48$ ).

Quanto ao tipo de raça das doentes, também não se verificaram diferenças entre GB e GL pois, em GB registaram-se 12 animais de raça pura e 13 sem raça definida; e em GL registaram-se 11 animais de raça pura e 14 sem raça definida.

Mais, é importante referir que as concentrações de PCR não foram afectadas pelo uso do fármaco Carprofeno administrado pré-cirurgicamente a cada uma das doentes, já que os medicamentos deste grupo de Anti-Inflamatórios Não-Esteróides (AINEs) actuam sobre o sistema das Ciclo-Oxigenases (COX), e a síntese da PCR é induzida por citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, a IL-6 e o TNF- $\alpha$ , as quais dentro da cascata inflamatória são produzidas antes das COX.

Assim sendo, é possível concluir que os valores de PCR e da sua variação obtidos no presente estudo não foram afectados pelos diferentes parâmetros previamente referidos, mas apenas pelo tipo de técnica de incisão cirúrgica a que as doentes foram sujeitas.

De acordo com a bibliografia consultada, em cães saudáveis não foi encontrada nenhuma correlação entre o parâmetro idade e a concentração basal de PCR sérica, o que está de acordo com os resultados obtidos para ambos os grupos considerados GB e GL pois para a concentração de PCR em T0 o valor de  $p = 0,12$ ; e o valor de  $Rho = 0,23$  (Yamamoto et al., 1994; Kuribayashi et al., 2003).

Relacionando ainda o factor idade com a contagem de WBC, não se obteve nenhum resultado estatisticamente significativo entre eles, pois  $p = 0,17$  e  $Rho = 0,2$ . Apesar disso, foi possível verificar que as contagens de WBC diminuíram em função da idade dos doentes, o que está de acordo com o estudo de Brenten et al. (2016), que concluíram que a contagem de WBC se correlaciona negativamente com a idade em indivíduos saudáveis.



É actualmente bem conhecido o impacto que o factor raça tem na incidência de determinadas doenças, estando até ao momento caracterizadas mais de 370 doenças hereditárias descritas associadas a determinadas raças puras (Fleischer, Sharkey, Mealey, Ostrander & Martinez, 2008), é o exemplo, da raça Schnauzer Miniatura cuja concentração basal de PCR é mais elevada do que indivíduos de outras raças puras (Wong et al., 2011).

Até ao momento de escrita do presente estudo, não existe nenhum estudo que faça a comparação dos valores basais da PCR entre cães de raça pura e sem raça definida. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa quanto ao parâmetro raça pura e sem raça definida pois  $p = 0,79$ . Apesar disso, foi possível observar uma média na variação da concentração da PCR crescente em indivíduos de raças puras, e decrescente em indivíduos sem raça definida a qual contudo não se revelou estatisticamente significativa pois  $p = 0,37$ .

Quanto às técnicas de incisão cirúrgica utilizadas neste estudo, a amostra foi dividida em 2 grupos de acordo com a técnica utilizada: com lâmina de bisturi (GB), e com laser de CO2 (GL).

O laser de CO2 cirúrgico é uma técnica que utiliza a energia gerada pelo feixe de laser de CO2, a qual é altamente absorvida pela água (que é o constituinte principal da maioria dos tecidos biológicos), promovendo a vaporização celular dos mesmos devido ao efeito fototérmico que a água intracelular sofre resultando na vaporização da célula (Sawish, 2011). Esta energia do laser de CO2 pode ser utilizada segundo 3 modos diferentes: contínuo, pulsátil e superpulso. O modo superpulso caracteriza-se por reduzir o tempo de exposição dos tecidos à energia do Laser de CO2 apenas a poucos milissegundos, enquanto fornece energia elevada em cada pico. Tem a vantagem de no momento de descanso entre cada pico de energia, permitir o arrefecimento dos tecidos e consequentemente diminuir a lesão térmica aos tecidos adjacentes (Patel, 2013; Carreira & Azevedo, 2016; Carreira et al., 2017).

O parâmetro potência é um factor que influencia a interacção fototérmica entre o laser de CO2 e os tecidos atingidos. Em 1995, Wilder-Smith et al., observaram que a temperatura dos tecidos adjacentes ao local de incisão efectuada pelo laser de CO2, aumentava à medida que a potência utilizada era mais elevada. Tal facto resulta porque quanto maior a potência utilizada, maior é a taxa de calor gerado localmente, ultrapassando a partir de um determinado momento a capacidade de dissipação da energia absorvida através dos tecidos adjacentes. Considerando esta informação, seria de esperar o desenvolvimento de uma maior resposta inflamatória tecidular local associada a um aumento da potência do laser de CO2 devido a

possíveis lesões térmicas provocadas por um aumento da potência. Contudo de acordo com os resultados obtidos, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na variação da concentração de PCR e a potência utilizada no aparelho de laser de CO<sub>2</sub> pois  $p = 0,94$ . Estes resultados poderão relacionar-se com o facto de apenas terem sido utilizados 2 valores de potência diferentes – 12 W e 15 W, podendo este intervalo de potência não ser tão disperso que se registre variação nos resultados quanto às lesões térmicas nos tecidos adjacentes ao local de uso do laser de CO<sub>2</sub>. Assim, a realização de um estudo que utilize um intervalo de valores de potência mais abrangente poderá colher resultados diferentes.

Também, considerando que o laser de CO<sub>2</sub> cirúrgico foi utilizado sempre em modo de superpulso, pode ter influenciado os resultados obtidos, já que nesta modalidade a energia do laser de CO<sub>2</sub> que atinge os tecidos é interrompida pontualmente, permitindo que a energia gerada pelo laser de CO<sub>2</sub> se dissipe nos tecidos adjacentes. É possível que com a utilização do laser de CO<sub>2</sub> em modo contínuo, se obtenha diferentes resultados quanto à relação do parâmetro potência e a variação de concentração da PCR.

No que respeita à contagem de WBC e a concentração da PCR em T0, não foi possível estabelecer qualquer tipo de relação estatisticamente significativa pois  $p = 0,27$  e  $Rho = -0.16$ . Estes resultados não estão de acordo com os resultados obtidos no estudo de Nakamura et al. (2008), que conseguiu estabelecer uma correlação fraca positiva entre a contagem de WBC e a concentração da PCR sérica, verificando que contagens de WBC acima dos valores de referência se correlacionam a um aumento dos valores de concentração da PCR. A razão para que os resultados obtidos no presente estudo se distanciem dos do estudo de Nakamura et al. (2008), poderá relacionar-se com o facto de nenhuma das participantes no estudo ter apresentado contagens de WBC acima dos valores de referência.

## **VI - Conclusão**

De acordo com os resultados obtidos é possível concluir que o uso do Laser de CO<sub>2</sub> cirúrgico, está associado a um melhor controlo do fenómeno de inflamação tecidular num cenário cirúrgico comparativamente ao uso da lâmina de bisturi, pois as variações entre os valores de PCR foram de um modo significativo estatisticamente menores. A consequência desta realidade traduz-se no final numa melhoria da qualidade peri-operatória ao doente intervencionado com a técnica de incisão com laser de CO<sub>2</sub> cirúrgico, já que o mesmo apresentará um menor nível de reacção inflamatória por menor traumatismo sofrido pelos tecidos intervencionados e adjacentes, associando-se a menor dor e a uma recuperação pós-cirúrgica mais célere.

## VII - Bibliografia

- Abt, E., Wigdor, H., Lobraico, R., Carlson, B., Harris, D., & Pycrz, R. (1987). Removal of benign intraoral masses using the CO2 laser. *Journal of the American Dental Association* (1939), 115(5), 729–731.
- Alberto, M. P., Asta, T., Damián, E., Silvia, M. S., & José, J. C. (2017). Use of heterologous immunoassays for quantification of serum proteins: The case of canine C-reactive protein. *PLoS ONE*, 12(2), 1–14.
- Bartels, K. E. (2002). Lasers in veterinary medicine—where have we been, and where are we going? *Vet Clin Small Anim*, 32, 495–515.
- Brenten, T., Morris, P. J., Salt, C., Raila, J., Kohn, B., Schweigert, F. J., & Zentek, J. (2016). Age-associated and breed-associated variations in haematological and biochemical variables in young labrador retriever and miniature schnauzer dogs. *Veterinary Record Open*, 3(1).
- Carreira, L. M., & Azevedo, P. (2016). Comparison of the influence of CO2-laser and scalpel skin incisions on the surgical wound healing process. *ARC Journal of Anesthesiology*, 1(3), 1–8.
- Carreira, M. L., Ramalho, R., Nielsen, S., & Azevedo, P. (2017). Comparison of the hemodynamic response in general anesthesia between patients submitted to skin incision with scalpel and CO2 laser using dogs as an animal model. A preliminary study. *ARC Journal of Anesthesiology*, 2(1), 24–30.
- Caspi, D., Baltz, M., Snel, F., Gruys, E., Niv, D., Batt, R. M., Munn, E. A., Buttress, N., Pepys, M. B. (1984). Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology*, 53(2), 307–313.
- Cerón, J. J., Eckersall, P. D., & Martínez-Subiela, S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: Current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(2), 85–99.
- Christensen, M. B., Eriksen, T., & Kjelgaard-Hansen, M. (2015). C-reactive protein: Quantitative marker of surgical trauma and post-surgical complications in dogs: A systematic review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57(1), 1–10.
- Clark, G. N., & Sinibaldi, K. R. (1994). Use of a carbon dioxide laser for treatment of elongated soft palate in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 11, 1779-1781.
- Cray, C., Zaias, J., & Altman, N. H. (2009). Acute phase response in animals: a review. *Comp Med*, 59(6), 517–526.
- Davidson, E. B., Davis, M. S., Campbell, G. A., Williamson, K. K., Payton, M. E., Healey, T. S., & Bartels, K. E. (2001). Evaluation of carbon dioxide laser and conventional incisional techniques for resection of soft palates in brachycephalic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219(6), 776–781.
- Debias, D. A., Dorf, B., Greene, C. H., Henderson, M. J., Radin, A. L., Fair-Covely, R., & Young-Seidman, W. L. (1994). Healing of incisions in the tongue: A comparison of results with

milliwatt carbon dioxide laser tissue welding versus suture repair. *Annals of Otolology, Rhinology & Laryngology*, 103(12), 964–974.

Dillman, R. C., Coles, E. H. (1966). A canine serum fraction analogous to human C-reactive protein. *Am J Vet Res.*, 27(17), 1769 – 1775.

Dunié-Mérigot, A., Bouvy, B., & Poncet, C. (2010). Comparative use of CO2 laser, diode laser and monopolar electrocautery for resection of the soft palate in dogs with brachycephalic airway obstructive syndrome. *Veterinary Record*, 167(18), 700–704.

Dye, T. L., Teague, H. D., Ostwald, D. A., & Ferreira, S. D. (2002). Evaluation of a technique using the carbon dioxide laser for the treatment of aural hematomas. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 38(4), 385–390.

Eckersall, P. D., & Conner, J. G. (1988). Bovine and canine acute phase proteins. *Veterinary Research Communications*, 12(2–3), 169–178.

Eckersall, P. D., Conner, J. G., & Harvie, J. (1991). An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein. *Veterinary Research Communications*, 15(1), 17–24.

Fisher, I. E., Frame, J. W., Browne, R. M., & Tranter, R. M. D. (1983). A comparative histological study of wound healing following CO2 laser and conventional surgical excision of canine buccal mucosa. *Archs Oral Biol*, 28(4), 287–291.

Fleischer, S., Sharkey, M., Mealey, K., Ostrander, E. A., & Martinez, M. (2008). Pharmacogenetic and metabolic differences between dog breeds: their impact on canine medicine and the use of the dog as a preclinical animal model. *The AAPS Journal*, 10(1), 110–119.

Gruys, E., Toussaint, M. J. M., Niewold, T. A., & Koopmans, S. J. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 6B(11), 1045–1056.

Hayashi, S., Jinbo, T., Iguchi, K., Shimizu, M., Shimada, T., & Nomura, M. (2001). A Comparison of the Concentrations of C-reactive Protein and alfa1 -Acid Glycoprotein in the Serum of Young and Adult Dogs with Acute Inflammation. *Veterinary Research Communications*, 25(2), 117–126.

Hillström, A., Hagman, R., Tvedten, H., & Kjelgaard-Hansen, M. (2014). Validation of a commercially available automated canine-specific immunoturbidimetric method for measuring canine C-reactive protein. *Veterinary Clinical Pathology*, 43(2), 235–243.

Holt, T. L., & Mann, F. A. (2002). Soft tissue application of lasers. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 32(3), 569–599.

Kaplan, I., Kott, I., & Giller, S. The CO<sub>2</sub> laser in the treatment of lesions of the Eyelids and Periorbital Region. *J Clin Laser Med Surg*. (1996), 14(4), 185–187.

Kjelgaard-Hansen, M., Kristensen, A. T., & Jensen, A. L. (2003). Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of C-reactive protein in canine serum. *Journal of Veterinary Medicine. A: Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 50(3), 164–168.

Kjelgaard-Hansen, M., Jensen, A. L., & Kristensen, A. T. (2003). Evaluation of a commercially

available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. *Veterinary Clinical Pathology*, 32(2), 81–87.

- Kuribayashi, T., Shimada, T., Matsumoto, M., Kawato, K., Honjyo, T., Fukuyama, M., Yamamoto, Y., Yamamoto, S. (2003). Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy beagle dogs of various ages and pregnant beagle dogs. *Experimental Animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 52(May), 387–390.
- Laflamme, D. P. Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine Practice*, 22, 10-15
- Lanzafame, R. J., Rogers, D. W., Naim, J. O., Herrera, H. R., DeFranco, C., & Hinshaw, J. R. (1986). The effect of CO<sub>2</sub> laser excision on local tumor recurrence. *Lasers in Surgery and Medicine*, 6(2), 103–105.
- Lanzafame, R. J., Rogers, D. W., Naim, J. O., DeFranco, C. A., Ochej, H., & Hinshaw, J. R. (1986). Reduction of local tumor recurrence by excision with the CO<sub>2</sub> laser. *Lasers in Surgery and Medicine*, 6(5), 439–441.
- Lanzafame, R. J., Qiu, K., Rogers, D. W., Naim, J. O., Caldwell, F. C., Perry, F., Hall, D., Hinshaw, J. R. (1988). Comparison of local tumor recurrence following excision with the CO<sub>2</sub> laser, Nd:YAG laser, and Argon Beam Coagulator. *Lasers in Surgery and Medicine*, 8(5), 515–520.
- Lapid-Gortzak, R., Lapid, O., Monos, T., Lifshitz, T. (2000) CO<sub>2</sub>-laser in the removal of a plexiform neurofibroma from the eyelid. *Ophthalmic Surg Lasers*, 31(5),432-4.
- Lobik, L., Ravid, A., Nissenkorn, I., Kariv, N., Bernheim, J., & Katzir, A. (1999). Bladder welding in rats using controlled temperature CO<sub>2</sub> laser system. *Journal of Urology*, 161(5), 1662– 1665.
- Martínez-Subiela, S., & Cerón, J. J. (2005). Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirubinemia, and anticoagulants in canine C-reactive protein, serum amyloid A, and ceruloplasmin assays. *Canadian Veterinary Journal*, 46(7), 625–629.
- Michelsen, J., Heller, J., Wills, F., & Noble, G. (2012). Effect of surgeon experience on postoperative plasma cortisol and C-reactive protein concentrations after ovariohysterectomy in the dog: A randomised trial. *Australian Veterinary Journal*, 90(12).
- Nakamura, M., Takahashi, M., Ohno, K., Koshino, A., Nakashima, K., Setoguchi, A., Fujino, Y., Tsujimoto, H. (2008). C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 70(2), 127–131.
- Otabe, K., Sugimoto, T., Jinbo, T., Honda, M., Kitao, S., Hayashi, S., Shimizu, M., Yamamoto, S. (1998). Physiological levels of C-reactive protein in normal canine sera. *Veterinary Research Communications*, 22(2), 77–85.
- Paczuska, J., Kielbowicz, Z., Nowak, M., Antończyk, A., Ciaputa, R., & Nicpoń, J. (2014). The carbon dioxide laser: an alternative surgery technique for the treatment of common cutaneous tumors in dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(Table 2), 1.

- Palmer, S. E. (2002). Treatment of common cutaneous tumors using the carbon dioxide laser. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 1(1), 43–50.
- Paltrinieri, S. (2007). Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: The acute phase proteins. *Veterinary Research Communications*, 31(SUPPL. 1), 125–129.
- Parra, M. D., Tecles, F., Martínez-Subiela, S., & Cerón, J. J. (2005). C-reactive protein measurement in canine saliva. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(2), 139–144.
- Parra, M. D., Tuomola, M., & Cabezas-herrera, J. (2005). Use of a time-resolved immunofluorometric assay for determination of canine C-reactive protein concentrations in whole blood. *Proteins*, 66(1), 62–66.
- Parra, M. D., Papasouliotis, K., & Cerón, J. J. (2006). Concentrations of C-reactive protein in effusions in dogs. *Veterinary Record*, 158(22), 753–757.
- Patel, A. (2013). Laser Airway Fire Protocol. *Benumof and Hagberg's Airway Management*.
- Rayan, G. M., Pitha, J. V., Edwards, J. S., Everett R. B. (1991). Effects of CO2 laser beam on cortical bone. *Lasers in Surgery and Medicine*, 11, 58–61.
- Romanos, G., Siar, C. H., Ng, K., & Toh, C. G. (1999). A preliminary study of healing of superpulsed carbon dioxide laser incisions in the hard palate of monkeys. *Lasers in Surgery and Medicine*, 24(5), 368–374.
- Sawish, T. J. (2011). Oral Surgery for general practitioner. Principles and Practice of Laser Dentistry
- Shelley, B. A. (2002). Use of the carbon dioxide laser for perianal and rectal surgery. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 32(3), 621–37.
- Sibanda, S., Hughes, J. M. L., Pawson, P. E., Kelly, G., & Bellenger, C. R. (2006). The effects of preoperative extradural bupivacaine and morphine on the stress response in dogs undergoing femoro-tibial joint surgery. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 33(4), 246–257.
- Stedile, R., Beck, C. A. C., Schiochet, F., Ferreira, M. P., Oliveira, S. T., Martens, F. B., Muccillo, M. S. (2009). Laparoscopic versus open splenectomy in dogs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(8), 653–660.
- Tagata, K., Yokoyama, S., Ginbo, T., Honda, M., Okimura, T., Odakura, M., Nomura, M., Yamamoto, S. (1996). Quantitative capillary reversed passive latex agglutination test for C-reactive protein (CRP) in the dog. *Veterinary Research Communications*, 20(1), 21–30.
- Tizard, I. (2012) Innate immunity: the recognition of invaders. *Veterinary immunology*. (9ª edição). (pp. 11-20). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Tizard, I. (2012) Innate immunity: proinflammatory and antimicrobial mediators. *Veterinary immunology*. (9ª edição). (pp. 21-30). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Tizard, I. (2012) Innate immunity: neutrophils and phagocytosis. *Veterinary immunology*. (9ª edição). (pp. 30-41). St. Louis, Missouri: Elsevier.

- Tizard, I. (2012) Innate immunity: macrophages and recovery from inflammation. *Veterinary immunology*. (9ª edição). (pp. 41-52). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Tizard, I. (2012) Systemic responses to inflammation. *Veterinary immunology*. (9ª edição). (pp. 52-61). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Wilder-Smith, P., Arrastia, a M., Liaw, L. H., & Berns, M. (1995). Incision properties and thermal effects of three CO2 lasers in soft tissue. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 79(6), 685–691.
- Wong, V. M., Kidney, B. A., Snead, E. C. R., Myers, S. L., & Jackson, M. L. (2011). Serum C-reactive protein concentrations in healthy Miniature Schnauzer dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 40(3), 380–383.
- Yamamoto, S., Shida, T., Miyaji, S., Santsuka, H., Fujise, H., Mukawa, K., Nagae, T., Naiki, M. (1993). Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Veterinary Research Communications*, 17(2), 85–93.
- Yamamoto, S., Shida, T., Okimura, T., Otabe, K., Honda, M., Ashida, Y., Sarikaputi, M., Naiki, M. (1994). Determination of C-reactive protein in serum and plasma from healthy dogs and dogs with pneumonia by ELISA and slide reversed passive latex agglutination test. *The Veterinary Quarterly*, 16(2), 74–77.
- Yamashita, K., Funjianga, T., Miyamoto, T., Hagio, M., Izumisawa, Y., Kotani, T. (1994). Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase proteins in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 56(3), 487–492.